

**Entwicklung porciner und humaner
organotypischer cornealer Zellkulturmodelle
für in vitro Permeationsuntersuchungen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Stephan Reichl
aus Gardelegen

1. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann
2. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. R. Winter
eingereicht am:	13. 01. 2003
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09. 04. 2003
Druckjahr	2003

Für Jessica
und
meine Familie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei dessen Bearbeitung sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. R. Winter danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes für die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit sowie für hilfreiche Unterstützung und fachliche Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dagmar Hahne und Frau Britta Meier für ihre tolle Unterstützung und ihren Einsatz im Zellkulturlabor bedanken. Weiterhin danke ich Frau Karin Becker für ihre Unterstützung bei der Durchführung von SDS-PAGE und Western-Blot Untersuchungen.

Frau Dr. Stefanie Tegtmeier danke ich für die Einführung in die Zellkultur und die anregenden fachlichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Arnold Eilmes von der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig für die Überlassung der Schweineaugen und seine freundliche Hilfsbereitschaft.

Weiterhin danke ich:

dem Pathologischen Labor Dr. Parussis, besonders herzlich Frau Karin Solga, für die Anfertigung der histologischen Schnittpräparate.

Herrn Hoche, Institut für Schweißtechnik der TU Braunschweig, für seine Unterstützung bei den Arbeiten am Rasterelektronenmikroskop.

der Hornhautbank der Medizinischen Hochschule Hannover für die Unterstützung mit humanen scleralen Ringen

Herrn Dr. Jürgen Bednarz, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Uniklinikums Eppendorf Hamburg, für die Überlassung der humanen cornealen Endothelzelllinie.

der Firma Nestec, insbesondere Frau Dr. Elizabeth Offord-Carvin vom Nestle Research Center in Lausanne, für die zur Verfügungstellung der CEPI 17 CL 4 Zelllinie.

Herrn Sven Anke, Institut für Pharmazeutische Biologie der TU Braunschweig, für seine freundliche Unterstützung bei den Arbeiten zur Fluoreszenzdetektion.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Reichl S, Müller-Goymann CC (2001) Entwicklung eines organotypischen Korneakonstruktes als ein In-vitro-Modell für Permeationsstudien. *Ophthalmologie* 98:853-858

Reichl S, Müller-Goymann CC (2003) The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm* 250:191-201

Tagungsbeiträge

Reichl S, Müller-Goymann CC (2000) Isolation and culture of porcine corneal cells (Poster) 3rd World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Berlin

Reichl S, Müller-Goymann CC (2000) Reconstructed porcine cornea as an in vitro model for permeation studies (Vortrag) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Münster, Abstract in *Arch. Pharm.* 333, Suppl. 2, 19 (2000)

Reichl S, Müller-Goymann CC (2001) Cultivation of a porcine organotypic cornea construct and its use for various in vitro permeation studies (Poster) Jahrestagung der DPhG, Halle/Saale, Abstract in *Arch. Pharm.* 334, Suppl. 2, 73 (2001)

Reichl S, Müller-Goymann CC (2002) Befunolol hydrochloride permeation through a porcine organotypical cornea construct (Poster) 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Florenz

Reichl S, Bednarz J, Müller-Goymann CC (2002) Evaluation of a human cornea equivalent as in vitro model for determination of drug permeability across the cornea (Vortrag) Jahrestagung der DPhG, Berlin, Abstract in *Arch. Pharm.* 335, Suppl. 1, 57 (2002)

Reichl S, Bednarz J, Müller-Goymann CC (2003) Ein humanes Cornea-Konstrukt für in vitro Permeationsuntersuchungen - Einfluss von Endothel und Stroma auf die Barriereigenschaften des Konstruktes (Poster) Doktorandentagung der DPhG, Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1.	Das Auge	3
2.1.1.	Die äußere Augenhaut	3
2.1.2.	Die mittlere Augenhaut	4
2.1.3.	Die innere Augenhaut	4
2.2.	Die Cornea	4
2.2.1.	Das Epithel	6
2.2.2.	Basalmembran	6
2.2.3.	Bowman-Membran	7
2.2.4.	Das Stroma	7
2.2.5.	Descemet-Membran	7
2.2.6.	Das Endothel	8
2.3.	Erkrankungen des Auges unter Berücksichtigung der Therapie	8
2.3.1.	Das Glaukom	8
2.3.1.1.	Primäres Glaukom	9
2.3.1.2.	Sekundäres Glaukom	9
2.3.1.3.	Arzneistoffe	10
2.3.2.	Entzündliche Erkrankungen des Auges	12
2.3.2.1.	Arzneistoffe	13
2.4.	Arzneiformen zur Anwendung am Auge	13
2.5.	Zellkulturen	16
2.5.1.	Corneale Zellkulturen	17
2.5.1.1.	Corneale Endothelzellen	17
2.5.1.2.	Corneale Epithelzellen	19
2.5.1.3.	Corneale Stromazellen	21
2.5.2.	Organotypische Zellkulturmodelle und deren Verwendung	21
2.5.3.	Zellkulturmodelle der Cornea	22
2.6.	Corneale Absorption von Arzneistoffen	24

3	Material und Methoden	28
3.1.	Material	28
3.1.1.	Biologisches Material	28
3.1.2.	Arzneistoffe	28
3.1.3.	Rezepturgrundstoffe	29
3.1.4.	Ophthalmika	30
3.1.4.1.	Fertigarzneimittel	30
3.1.4.2.	Weitere Formulierungen	31
3.2.	Methoden	32
3.2.1.	Zellkulturen	32
3.2.1.1.	Porcine Zellkulturen	32
3.2.1.1.1.	Zellisolierung und Anlegen von Primärkulturen	32
3.2.1.1.1.1.	Präparierung der Cornea	32
3.2.1.1.1.2.	Cornea-Endothelzellen	33
3.2.1.1.1.3.	Cornea-Stromazellen	33
3.2.1.1.1.4.	Cornea-Epithelzellen	33
3.2.1.2.	Kultivierung und Subkultivierung	35
3.2.1.3.	Kryokonservierung und Aussaat-effizienz	35
3.2.1.4.	Mikroskopie	36
3.2.1.5.	Immunocytochemische Untersuchungen	36
3.2.1.6.	Wachstumsverhalten der Corneazellen	37
3.2.1.7.	Humane Zellkulturen	37
3.2.1.7.1.	Immortalisierte humane Epithelzellen – CEPI 17 CL 4	37
3.2.1.7.2.	Immortalisierte humane Endothelzellen – HENC	38
3.2.1.7.3.	Native humane Fibroblasten	38
3.2.2.	Aufbau des organotypischen Cornea-Konstruktes	39
3.2.2.1.	Präparation des Rattenschwanzkollagens	39
3.2.2.2.	Porcines Cornea-Konstrukt	39
3.2.2.3.	Humanes Cornea-Konstrukt	42
3.2.3.	Histologische Untersuchungen	42
3.2.3.1.	Histologische Schnittpräparate	42
3.2.3.1.1.	Histochemische Färbung	43
3.2.3.2.	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	43
3.2.3.3.	Immunhistologie	44
3.2.3.3.1.	Vorbereiten der Kulturen	44
3.2.3.3.2.	Immunhistologischer Laminin-Nachweis	44

3.2.3.3.3. Immunhistologischer Fibronektin-Nachweis	45
3.2.4. Elektrophoretische Bestimmung des Keratinmusters der Kulturen	45
3.2.4.1. Vorbereiten der Kulturen	45
3.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.2.5. Western-Blot	47
3.2.5.1. Blotten von Elektrophoresegelen	47
3.2.5.2. Immunblotting	49
3.2.6. Permeationsuntersuchungen	49
3.2.7. HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe	50
3.2.8. Dichtebestimmung	51
3.2.9. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten n-Octanol/wässrige Lösungen	51
3.2.10. pH-Wert-Bestimmung	52
3.2.11. Prüfung auf signifikante Unterschiede von Mittelwerten (<i>t</i> -Test)	52
 4 Versuchsergebnisse und Diskussion	 53
 4.1. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der cornealen Zellen	 53
4.1.1. Primärkultivierung der porcinen cornealen Zellen	53
4.1.1.1. Porcine Cornea-Endothelzellen	53
4.1.1.2. Porcine Cornea-Stromazellen	53
4.1.1.3. Porcine Cornea-Epithelzellen	54
4.1.2. Subkultivierung	56
4.1.3. Kryokonservierung und Aussaat-effizienz	57
4.1.4. Immuncytochemische Charakterisierung	58
4.1.5. Wachstumsverhalten der cornealen Zellen	60
4.1.5.1. Wachstumsverhalten der cornealen Endothelzellen	61
4.1.5.2. Wachstumsverhalten der cornealen Epithelzellen	62
4.1.5.3. Wachstumsverhalten der cornealen Fibroblasten	62
4.1.6. Kultivierung der humanen cornealen Zellen	63
4.1.6.1. Humane Cornea-Epithelzellen – CEPI 17 CL 4	63
4.1.6.2. Humane Cornea-Endothelzellen – HENC	64
4.1.6.3. Humane Cornea-Stromazellen	66
4.1.7. Zusammenfassende Diskussion zur Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der cornealen Zellen	66
 4.2. Entwicklung und Aufbau des organotypischen Cornea-Konstruktes	 67
4.2.1. Entwicklung der in vitro Cornea aus porcinen cornealen Zellen	67

4.2.2. Entwicklung der in vitro Cornea aus humanen cornealen Zellen	70
4.2.3. Zusammenfassende Diskussion zur Entwicklung und den Aufbau porciner und humaner organotypischer Cornea-Konstrukte	74
4.3. Charakterisierung der organotypischen Cornea-Konstrukte	75
4.3.1. Immunhistologischer Nachweis der Basalmembrankomponenten Laminin und Fibronectin im porcinen Cornea-Konstrukt	75
4.3.2. Elektrophoretische Bestimmung des Keratinmusters im epithelialen Gewebe des porcinen Cornea-Konstruktes	79
4.3.3. Western-Blot-Untersuchungen der epithelialen Keratine des porcinen Cornea-Konstruktes	81
4.3.4. Oberflächenstrukturen des porcinen und humanen Cornea-Konstruktes	83
4.3.5. Zusammenfassende Diskussion zur Charakterisierung der organotypischen Cornea-Konstrukte	87
4.4. Permeationsuntersuchungen	90
4.4.1. Porcines Cornea-Konstrukt	91
4.4.1.1. Permeationsuntersuchungen mit pilocarpinhaltigen Formulierungen durch die exzidierte porcine Cornea und das porcine Cornea-Konstrukt	91
4.4.1.1.1. Borocarpin [®] S Augentropfen	91
4.4.1.1.2. Pilogel [®] Augengel	93
4.4.1.1.3. Pilocarpol [®] Augentropfen	94
4.4.1.1.4. Spersacarpin [®] Augensalbe	95
4.4.1.1.5. Invers mizellare Lösung IML 2%	96
4.4.1.1.6. Einfluss von Benzalkoniumchlorid auf die Permeabilität der exzidierten porcinen Cornea und des porcinen Cornea-Konstruktes	97
4.4.1.1.7. Einfluss der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze auf die Permeabilität des porcinen Cornea-Konstruktes	99
4.4.1.1.8. Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen mit pilocarpinhaltigen Formulierungen durch die exzidierte porcine Cornea und das porcine Cornea-Konstrukt	100
4.4.1.2. Permeation einer Hydrocortison Lösung HC 0,02% OK	103
4.4.1.3. Permeationsuntersuchungen mit befunololhaltigen Formulierungen durch die exzidierte porcine Cornea und das porcine Cornea-Konstrukt	104
4.4.1.3.1. Glauconex [®] Augentropfen	105
4.4.1.3.2. BHCl-AG 1% Augengel	106
4.4.1.3.3. BHCl-AS 2% Augensalbe	107

4.4.1.3.4. Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen mit befunololhaltigen Formulierungen durch die exzidierte porcine Cornea und das porcine Cornea-Konstrukt	109
4.4.2. Humanes Cornea-Konstrukt	110
4.4.2.1. Permeationsuntersuchungen wässriger Formulierungen durch das humane Cornea-Konstrukt	110
4.4.2.1.1. Borocarpin® S Augentropfen	110
4.4.2.1.2. Hydrocortison Lösung HC 0,02% OK	111
4.4.2.1.3. Glauconex® Augentropfen	113
4.4.2.1.4. Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen wässriger Formulierungen durch das humane Cornea-Konstrukt	114
4.4.2.2. Permeationsuntersuchungen wässriger Formulierungen durch humane Cornea-Konstrukte unter Berücksichtigung des Einflusses von Endothel und Stroma auf die Barriereigenschaften des Konstruktes	116
4.4.2.2.1. Borocarpin® S Augentropfen	116
4.4.2.2.2. Hydrocortison Lösung HC 0,02% OK	118
4.4.2.2.3. Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen wässriger Formulierungen durch humane Cornea-Konstrukte unter Berücksichtigung des Einflusses von Endothel und Stroma auf die Barriereigenschaften des Konstruktes	119
5 Abschlusssdiskussion	120
5.1. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der porcinen cornealen Zellen	120
5.2. Aufbau und Charakterisierung des porcinen organotypischen Cornea-Konstruktes	121
5.3. Aufbau des humanen Cornea-Konstruktes	123
5.4. Vergleichende Permeationsuntersuchungen mit exzidiierter porciner Cornea und den Cornea-Konstrukten	124
5.4.1. Porcines Cornea-Konstrukt	124
5.4.2. Humanes Cornea-Konstrukt	126
6 Zusammenfassung	128
7 Literaturverzeichnis	130

1 Einleitung und Problemstellung

In der Entwicklung neuer ophthalmologischer Wirkstoffe oder Arzneiformen zur Anwendung am Auge ist es unerlässlich, Untersuchungen zur Arzneistoffabsorption in das Auge durchzuführen. Im Allgemeinen stellt hierbei die Hornhaut des Auges (Cornea) die Hauptbarriere für topisch applizierte Arzneistoffe dar.

Notwendige in vitro Untersuchungen über das transcorneale Permeationsverhalten von Arzneistoffen aus Zubereitungen zur Anwendung am Auge werden zum überwiegenden Teil mit exzidierten Hornhäuten von Versuchs- und Schlachttieren durchgeführt. Dies bringt eine Reihe von Nachteilen mit sich. Zum einen ist das Töten von Tieren für experimentelle Zwecke kritisch zu beurteilen. Zudem stellt sich die entsprechende Tierhaltung als sehr personal- und kostenintensiv dar. Darüber hinaus ist die Verfügbarkeit von homogenem Schlachtmateriel deutlich beschränkt. Zum anderen ist weiterhin unklar, in wieweit mit tierischem Material gewonnene Daten auf die humanen Verhältnisse übertragbar sind.

Dem Einsatz von Zellkulturen als in vitro Testsysteme kommt in der Forschung eine immer größer werdende Bedeutung zu. Die vorliegende Arbeit entstand daher unter dem Aspekt, ausgehend von porcinen cornealen Zellkulturen, durch Geweberekonstruktion eine Alternative zu exzidierten Hornhäuten für in vitro Permeationsuntersuchungen zu entwickeln. Bei Verwendung von humanem cornealem Zellmaterial ergäbe sich somit die Möglichkeit, ein in vitro Modell der humanen Cornea für Permeationsuntersuchungen zu schaffen. Ein solches humanes Konstrukt wäre von großer Bedeutung, da in Ermangelung von humanen exzidierten Hornhäuten für Permeationszwecke keine entsprechenden in vitro Permeationsdaten für den Menschen existieren.

Ein organotypisches dreidimensionales Cornea-Konstrukt entsteht unter Verwendung der drei verschiedenen cornealen Zelltypen durch schrittweise Rekonstruktion der einzelnen Schichten. Somit muss eine Isolierung und die Kultivierung der Corneazellen vorangehen.

Es wird davon ausgegangen, dass die Ausbildung adäquater Barriereigenschaften der in vitro Cornea mit der Expression corneatypischer Parameter einhergeht, so dass neben der Entwicklung die Charakterisierung des Cornea-Konstruktes hinsichtlich dieser Merkmale ebenso ein Grundziel dieser Arbeit darstellt wie die abschließende Beurteilung der Permeationsbarriereigenschaften. Durch vergleichende Untersuchungen zur Permeation von Wirkstoffen durch das Gewebe soll Aufschluss darüber gewonnen werden, in wieweit die Permeabilität des Cornea-Konstruktes mit der Permeabilität der exzidierten Cornea vergleichbar ist, um als in vitro Modell verwendet werden zu können.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind deshalb:

- geeignete Methoden zur Isolierung, Standardkultivierung und Kryokonservierung der verschiedenen cornealen Zelltypen aus der exzidierten Cornea von Schlachtschweinen zu entwickeln.
- die unterschiedlichen porcinen cornealen Zelltypen in Kultur zu charakterisieren.
- ein porcines organotypisches Cornea-Konstrukt aufzubauen und dieses Gewebe-äquivalent hinsichtlich corneaspezifischer Parameter zu charakterisieren.
- darauf aufbauend ein Cornea-Konstrukt aus humanen Zellen zu entwickeln.
- zu untersuchen, ob die organotypischen porcinen und humanen Cornea-Konstrukte bei Permeationsuntersuchungen unter Verwendung verschiedener Arzneistoffe und Variation unterschiedlicher Einflüsse, insbesondere verschiedener Formulierungen, ähnliche Permeationsbarriereigenschaften aufweisen wie die exzidierte porcine Cornea und somit geeignete Modelle für transcorneale in vitro Permeationsstudien darstellen.

2 Allgemeiner Teil

2.1. Das Auge

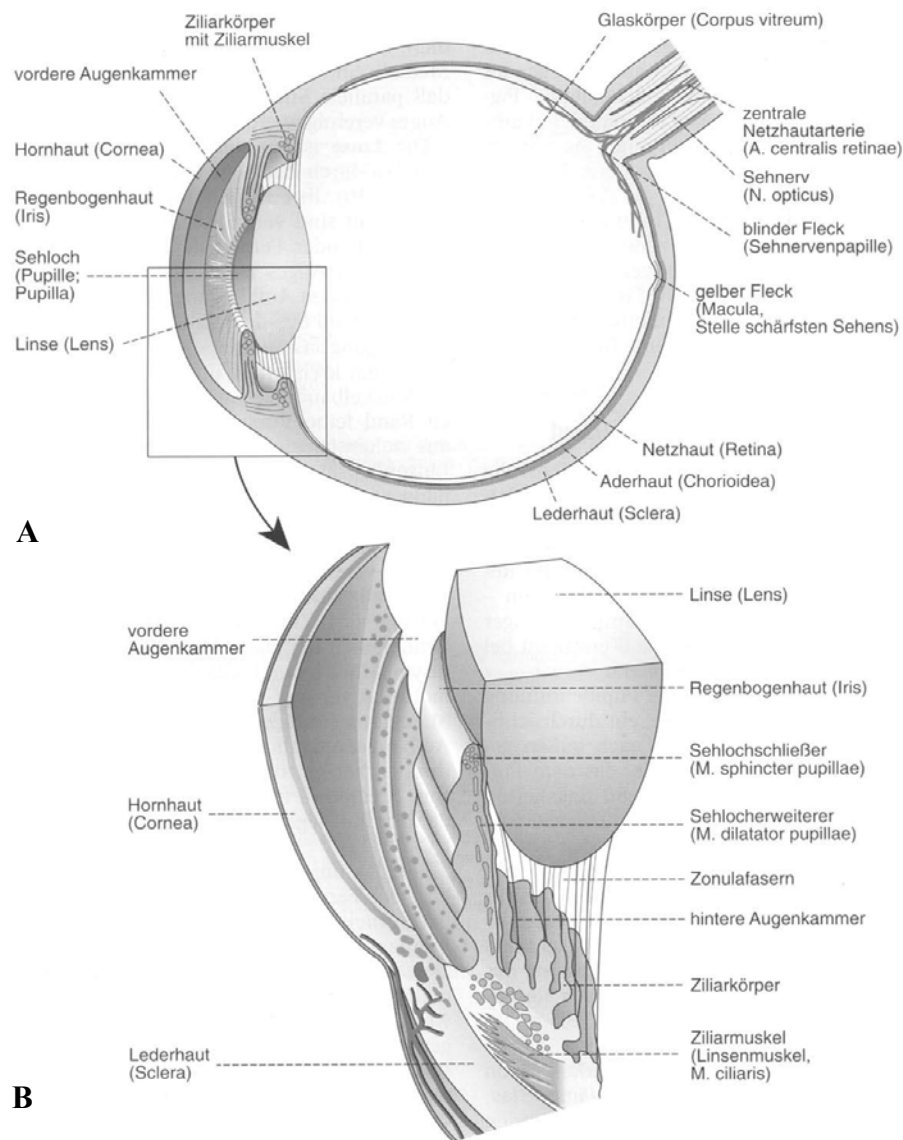


Abbildung 2.1: Schnittbild des Augapfels (Bulbus) (A), sowie Ausschnitt (B) mit Darstellung von Cornea, Iris und Linse [Speckmann und Wittkowski, 1994]

2.1.1. Die äußere Augenhaut

Die äußere Augenhaut (Tunica externa oculi) liefert das bindegewebige Skelett des Augapfels (Bulbus oculi) und setzt sich aus der durchsichtigen Hornhaut (Cornea), welche ungefähr das vordere Sechstel des Augapfels einnimmt, und der sehr derben, undurchsichtigen Lederhaut (Sclera) zusammen. Die gefäßlose Cornea zeichnet sich durch ihre Transparenz aus und

besteht wie auch die Sclera vorwiegend aus straffen, kollagenen Bindegewebsfasern. Diese Kollagenfasern weisen eine komplizierte, funktionell zweckmäßige Anordnung auf, da auf sie der intraokuläre Druck von etwa 15-16 mm Hg und der Zug der quergestreiften äußeren Augenmuskeln wirken.

2.1.2. Die mittlere Augenhaut

Die mittlere Augenhaut, welche auch als Uvea bezeichnet wird, umfasst die durchschnittlich 0,2 mm dicke Aderhaut (Chorioidea), welche der Sclera innen aufgelagert ist, den Ziliarkörper (Corpus ciliare) und die Regenbogenhaut (Iris).

Die vordere Augenkammer wird von der kleineren, seitlich der Linse gelegenen, hinteren Augenkammer durch die Iris getrennt und bildet den mit Kammerwasser gefüllten Raum zwischen Hornhauthinterfläche und Vorderfläche von Iris und Linse. Die Linse selbst befindet sich unmittelbar hinter der Pupille und der Iris, wobei sie rückseitig an den gallertartigen Glaskörper grenzt. Sie ist mit ihrem Aufhängeapparat (Zonula ciliaris), welcher die hintere Augenkammer durchzieht, am Ziliarkörper verankert, welcher im Dienste der Akkommodation an der Änderung der Brennweite der Linse beteiligt ist.

2.1.3. Die innere Augenhaut

Die innere Augenhaut besteht aus der Netzhaut (Retina) und dem Pigmentepithel (Pars pigmentosa), welches das äußere, der Aderhaut anliegende Blatt der Netzhaut darstellt. Diese Epithelzellen erscheinen aufgrund von dunklem Farbstoff schwarz und schützen das Augeninnere vor störenden Reflexerscheinungen. Die Netzhaut mit ihren lichtempfindlichen Rezeptoren und nachgeschalteten Nervenzellen ist maßgeblich am Sehvorgang beteiligt [Speckmann und Wittkowski, 1994].

2.2. Die Cornea

Die Cornea gehört zum vorderen Augenabschnitt und trennt die vordere Augenkammer mit ihrem Kammerwasser von der Luftumgebung. Sie hat somit eine ausgeprägte Schutzfunktion zu erfüllen. Die Cornea bildet einen Teil des optischen Systems und nur durch ihre Transparenz wird der Sehvorgang überhaupt ermöglicht. Diese bemerkenswerte Transparenz des Gewebes wird in erster Linie durch den richtigen Hydratationsgrad des Hornhautstromas,

die Formkonstanz der Cornea und letztendlich auch durch die Gefäßfreiheit gewährleistet [Rohen, 1996].

Die humane Hornhaut stellt eine konvex-konkave, elliptische Linse dar, deren Krümmungsradius zwischen 7-8 mm und deren Brechkraft mehr als 40 dptr beträgt [Kühnel, 1987]. Der horizontale Durchmesser ist im allgemeinen 1 mm größer als der vertikale Durchmesser und beträgt im Durchschnitt 11,6 mm. Die Hornhautdicke in vivo beträgt 0,58 mm im Hornhautzentrum und 0,67 mm in der Peripherie [Barraquer und Rutllán, 1991].

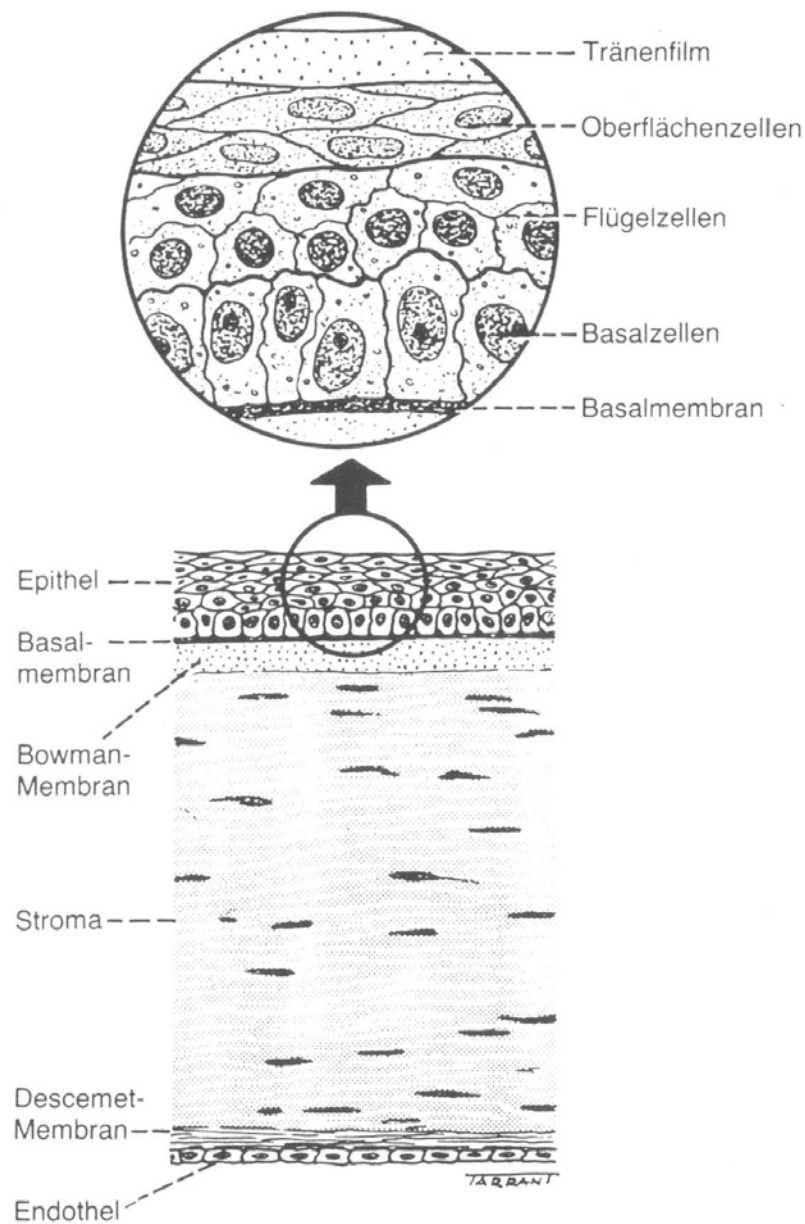


Abbildung 2.2: Anatomie der Hornhaut [Kanski und Spitznas, 1987]

Histologisch betrachtet hat die Cornea eine verhältnismäßig einfache Struktur. Wie in Abbildung 2.2 dargestellt, besitzt die humane Hornhaut im weitesten Sinne einen sechsschichtigen Aufbau. Einer Basalmembran ist ein mehrschichtiges Epithelgewebe aufgelagert. Unter der Basalmembran befindet sich die sogenannte Bowman-Membran, an die sich das stromale Gewebe anschließt. Zwischen dem Stroma und dem abschließenden einschichtigen Endothel befindet sich die Descemet-Membran.

2.2.1. Das Epithel

Beim cornealen Epithelgewebe handelt es sich um ein nicht verhornendes, mehrschichtiges Plattenepithel mit einer Dicke von ungefähr 50 µm, was ca. 10% der gesamten Hornhautdicke entspricht. Das humane Corneaepithel besteht aus 5 bis 6 Zellschichten [Nishida, 1997], während für die porcine Cornea 6 bis 9 epitheliale Schichten gezählt wurden [Ehlers, 1970]. Wie in Abbildung 2.2 zu erkennen ist, unterteilt sich das Epithel in 3 Zelltypen: die Basalzellen, die Flügelzellen und die Oberflächenzellen (Superfizialzellen).

Die säulenartigen **Basalzellen** bilden eine einschichtige Zellschicht, die mit Hemidesmosomen an der Basalmembran fixiert ist. Allein diese Basalzellen besitzen mitotische Aktivität. Aus ihnen entstehen die Flügel- und Oberflächenzellen. Dieser Differenzierungsprozess dauert 7-14 Tage bevor die Oberflächenzellen abschlüpfen und in den Tränenfilm abgegeben werden.

Die **Flügelzellen** sind in 2 oder 3 Zellschichten angeordnet und haben dünne stachelartige Fortsätze. Sie stellen das Zwischenstadium des Differenzierungsprozesses des Corneaepithels dar. An der Corneaoberfläche befinden sich 2 bis 4 Lagen von langen, extrem flachen, ausdifferenzierten **Oberflächenzellen**. Die Oberfläche der äußersten Zellen ist durch Falten (Microplicae) und Zotten (Microvilli) vergrößert. Ihnen ist der präcorneale Tränenfilm aufgelagert. Die Oberflächenzellen sind durch enge Zellkontakte (tight junctions), die eine interzelluläre Permeationsbarriere für Substanzen bilden, fest miteinander verknüpft.

2.2.2. Basalmembran

Die 40-60 nm dicke Basalmembran wird von den Basalzellen selbst gebildet. Hauptbestandteile sind Kollagen Typ IV, Laminin sowie Fibronectin. Sie scheint wichtig zu sein für die Erhaltung eines mehrschichtigen, gut organisierten Epithels und dessen Adhäsion an das Hornhautstroma. [Nishida, 1997].

2.2.3. Bowman-Membran

Die Bowman-Membran, auch Bowman-Schicht genannt, ist ein 12 µm dickes azelluläres Band zwischen Epithel und Stroma. Sie besteht aus zufällig angeordneten Kollagenfasern des Typs I und III sowie aus Proteoglykanen. Die genaue biologische Funktion der Bowman-Membran ist noch nicht vollständig geklärt, doch scheint auch sie der Strukturhaltung des Epithels zu dienen. Wird sie beschädigt, kann sie sich nicht regenerieren. Viele Säugetiere haben gar keine Bowman-Membran, im Gewebeschnitt der Hornhaut des Schweins ist lichtmikroskopisch ebenfalls keine Bowman-Membran zu erkennen. Auch Camber et al. (1987) beschreiben für die porcine Cornea die Abwesenheit einer klaren Bowman-Membran-Struktur.

2.2.4. Das Stroma

Das Stroma, welches mit ca. 90% der gesamten Hornhautdicke den größten Teil ausmacht, besteht hauptsächlich aus Wasser (ca. 75%), extrazellulärer Matrix sowie zu 2-3% aus spindelförmigen stromalen Zellen, die auch als Fibroblasten oder Keratozyten bezeichnet werden und im stromalen Gewebe netzwerkartig eingebettet vorliegen. Die extrazelluläre Matrix, welche von den Fibroblasten synthetisiert wird, besteht im Wesentlichen aus Kollagen und Glykosaminoglykanen. Das Kollagen setzt sich aus 90% Typ I, zu weniger als 10% aus Typ III und in Spuren aus Typ V zusammen [Radda und Menzel, 1983]. Die extrem regelmäßige Anordnung dieser Kollagenfibrillen sowie der relativ niedrige und konstante Wassergehalt des Stromas begründen die Durchsichtigkeit der Hornhaut.

2.2.5. Descemet-Membran

Die lichtmikroskopisch homogen erscheinende Descemet-Membran, die auch häufig als Basalmembran des Endothels bezeichnet wird, ist eine feine gitterzaunartige Anordnung von Kollagenfibrillen [Kanski und Spitznas, 1987] und hat eine Dicke von etwa 7 µm. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ IV und Laminin. Fibronektin ist ebenfalls Bestandteil der Descemet-Membran [Suda et al., 1981]. Auch die Descemet-Membran ist, wie die Bowman-Membran, nicht in der Lage zu regenerieren.

2.2.6. Das Endothel

Das Hornhautendothel ist die innerste Schicht der Cornea und bildet somit die Oberflächenbedeckung gegen die vordere Augenkammer. Es besteht aus einer einschichtigen Lage hexagonaler Zellen, die durch aktive und passive Prozesse für die Entquellung und Ernährung der Cornea sowie den konstanten Wassergehalt des Stromas verantwortlich sind. Das Endothel hat eine Dicke von etwa 5 μm , während die Zelldichte ca. 3.500 Zellen/ mm^2 beträgt. Da sich Endothelzellen ebenfalls nicht regenerieren, dehnen sich benachbarte Zellen bei Defekten aus, um diese Lücken wieder zu schließen. Aufgrund ihrer Funktion als Permeationsbarriere für Substanzen aus dem Kammerwasser in die Cornea weisen die Endothelzellen zahlreiche Zellverbindungen (tight junctions) auf [Svedberg und Bill, 1972].

2.3. Erkrankungen des Auges unter Berücksichtigung der Therapie

Pathologische Zustände und Erkrankungen des Auges sowie deren Behandlung mit Arzneistoffen, sofern es diese Arbeit betrifft, werden hier erläutert.

2.3.1. Das Glaukom

Das Glaukom (Grüner Star) gilt in Europa neben dem Diabetes mellitus als häufigste Ursache für erworbene Blindheit. Bei einer Glaukomerkrankung, von der etwa 5% der Bevölkerung betroffen sind, besteht ein Missverhältnis von intraokularem Druck einerseits und Drucktoleranz andererseits, wobei es ohne Behandlung, und leider oft auch trotz Behandlung, zum fortschreitenden Untergang von Sehnervfasern kommt [Quigley, 1987]. Die Folge davon sind Gesichtsfeldausfälle sowie Störungen des Kontrast- und Farbensehens. Bei der Entstehung eines Glaukomschadens, wobei man davon ausgeht, dass es sich beim Glaukom um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, spielt neben dem erhöhten Augeninnendruck als Hauptrisikofaktor auch eine gestörte Netzhautdurchblutung eine Rolle [von der Eltz, 2000]. Man unterteilt die Glaukomerkrankungen in primäre Glaukome, die etwa 80-90% aller Glaukome ausmachen [Bonomi et al., 1998], und in sekundäre Glaukome, wobei die Abgrenzung oft unscharf ist und uneinheitlich gehandhabt wird.

2.3.1.1. Primäres Glaukom

Beim primären Glaukom unterscheidet man das Offenwinkelglaukom (Glaucoma simplex) und das Winkelblockglaukom. In beiden Fällen ist eine Behinderung des Abflusses des Kammerwassers und seltenst die vermehrte Produktion des Kammerwassers die Ursache der intraokularen Drucksteigerung.

Das **Offenwinkelglaukom**, welches die weitaus häufigste Form des primären Glaukoms darstellt und auch mit zunehmenden Alter gehäuft auftritt [Wensor et al. 1998], ist dadurch gekennzeichnet, dass trotz offenen Kammerwinkels der Abflusswiderstand des Kammerwassers erhöht ist, wobei das Abflusshindernis wahrscheinlich in den Trabekeln liegt [Becker et al., 1972].

Das **Winkelblockglaukom** lässt sich wiederum in ein akutes Winkelblockglaukom, auch als akuter Glaukomanfall bezeichnet, sowie ein chronisches Winkelblockglaukom unterscheiden. Beim Winkelblockglaukom ist der Kammerwinkel verengt, so dass es zu Abflussbehinderungen des Kammerwassers und somit zum Anstieg des Augeninnendruckes kommt.

Beim akuten Glaukomanfall ist der Kammerwinkel komplett verlegt, so dass es zu einem starken Druckanstieg kommt, aus dem Schmerzen und Sehverschlechterung resultieren.

Das chronische Winkelblockglaukom ist durch einen verengten Kammerwinkel gekennzeichnet, wobei ein allmählich zunehmender Teil permanent verlegt ist, so dass der intraokulare Druck ständig erhöht ist.

Mitunter existieren auch Mischformen zwischen Offenwinkelglaukom und Winkelblockglaukom.

2.3.1.2. Sekundäres Glaukom

Als Sekundärglaukome sind Glaukomerkrankungen einzustufen, bei denen die intraokuläre Druckerhöhung eine Folge von Augen- oder Allgemeinerkrankungen ist, bzw. ein erkennbarer Grund für die Druckerhöhung vorliegt. Die Ursachen dafür können sehr vielfältig sein. So können sekundäre Glaukome zum Beispiel nach Verletzungen wie Prellung und Verätzung, nach Entzündungen wie einer Iridozyklitis, nach Gefäßneubildung auf der Iris, nach Ablagerung abnormen Materials im Kammerwinkel oder als Folge unerwünschter Arzneimittelwirkungen auftreten.

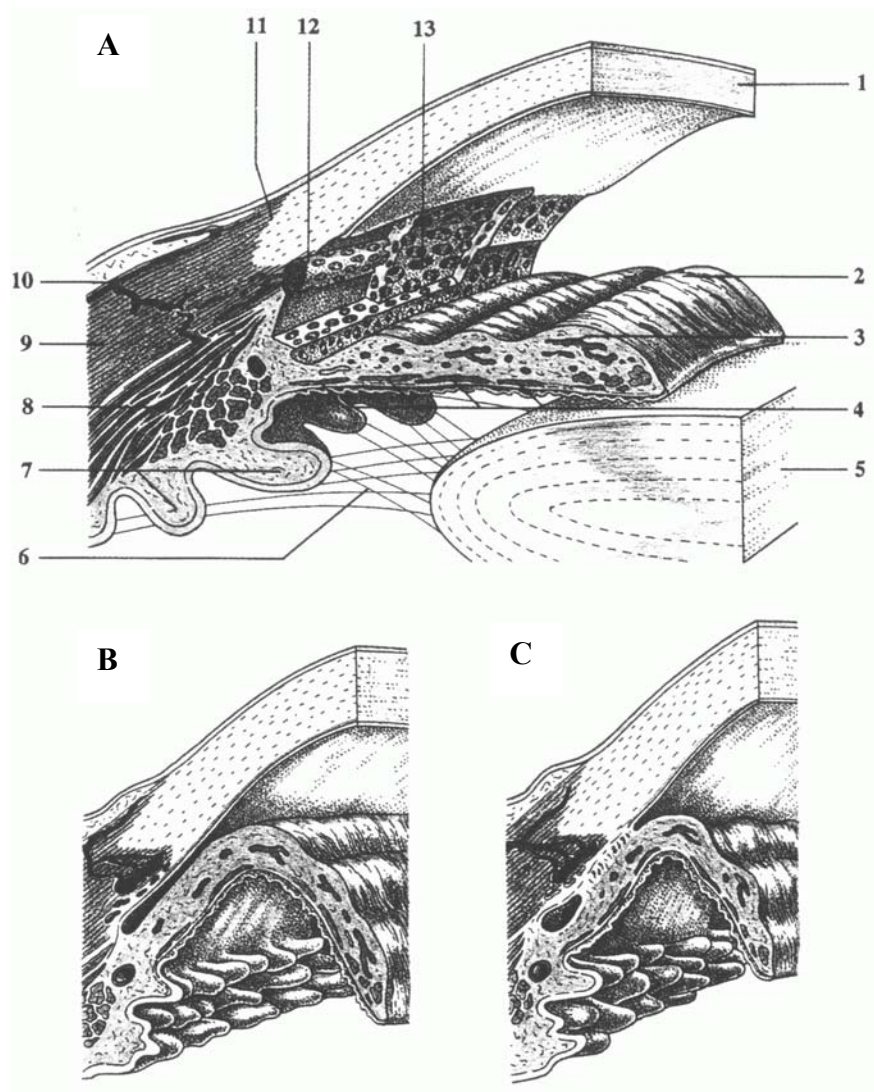


Abbildung 2.3: Schema der Kammerwinkelverhältnisse bei **A** normalem, **B** engem und **C** verschlossenem Kammerwinkel [Beck und Langhage, 1995]

2.3.1.3. Arzneistoffe

Da der Verbesserung der Drucktoleranz des Sehnerven noch immer enge Grenzen gesetzt sind, erscheint die Senkung des Augeninnendrucks als die sinnvollste Therapie des Glaukoms [Fechner und Teichmann, 2000].

Zur Zeit lassen sich die topisch zu applizierenden Arzneistoffe grob in 5 Klassen einteilen. So werden die Wirkstoffe in

- Parasympathomimetika (z.B. Pilocarpin, Carbachol, Aceclidin)
- Betarezeptorenblocker (β -Blocker) (z.B. Timolol, Befunolol, Betaxolol)
- Carboanhydrase-Hemmer (z.B. Dorzolamid, Brinzolamid)
- $\alpha 2$ -Agonisten (z.B. Apraclonidin, Brimonidin)
- Prostaglandinanaloga (z.B. Latanoprost, Travoprost)

unterschieden.

Die Parasympathomimetika (Miotika) sind in der Lage, über muscarinische Rezeptoren den Augeninnenmuskel (Iris-, Ziliarkörper) entweder direkt, wie durch Pilocarpin und Carbachol, oder indirekt durch Acetylcholinesterasehemmer zu aktivieren. Der gesteigerte Ziliarmuskeltonus bewirkt eine Senkung des Abflusswiderstandes und somit die gewünschte Drucksenkung [Bárány, 1962]. **Pilocarpin**, das als direkter Agonist an den cholinergen Rezeptoren wirkt, ist eines der meistverwendeten Miotika. Neben der Erhöhung des Kammerwasserabflusses ist wohl auch eine Hemmung der Kammerwasserproduktion an der Senkung des intraokulären Drucks beteiligt [Dolder und Skinner, 1990]. Wenn auch das Pilocarpin in den ersten Stufen zur konservativen Behandlung des Glaucoma simplex nur noch eine untergeordnete Rolle spielt, so wird es doch weiterhin zur Behandlung des akuten Winkelblock-Glaukoms eingesetzt [Fechner und Teichmann, 2000]. Pilocarpin wird auch häufig in Kombination mit anderen Glaukomtherapeutika verwendet. Nachteilig an der lokalen Therapie mit Pilocarpin sind die häufige Gabe (in der Regel: 2% Pilocarpin Augentropfen 3 \times täglich und zur Nacht als ölige Tropfen) sowie die unerwünschten Wirkungen, wie z.B. Myopisierung, Herabsetzung des Dämmerungssehens, schmerzhafte Miosis und Allgemeinreaktionen, die auf die parasympathomimetische Wirkung zurückzuführen sind [Dannheim und Pfeiffer, 1998].

Die augendrucksenkende Wirkung der Betarezeptorenblocker (β -Blocker), auch als betaadrenerge Sympatholytika bezeichnet, beruht auf einer Verminderung der Kammerwasserproduktion. Diese populärste Gruppe an Glaukommitteln wurde vor etwa 20 Jahren eingeführt und umfasst derzeit eine Reihe von verkehrsfähigen Substanzen. Der genaue Wirkungsmechanismus der Betablocker im Bezug auf die drucksenkende Wirkung wird kontrovers diskutiert und ist noch nicht abschließend geklärt, wobei man sich einig ist,

dass β -Blocker keinen wesentlichen Effekt auf den Kammerwasserabfluss haben [Fechner und Teichmann, 2000]. Die häufigste lokale unerwünschte Arzneimittelwirkung ist ein trockenes Auge mit Fremdkörpergefühl. Schwerwiegender allerdings sind die systemischen Nebenwirkungen durch β_1 -Blockade im kardiovaskulären Bereich und durch β_2 -Blockade im pulmonalen Bereich, die auch nach lokaler Applikation zu beobachten sind, woraus sich für disponente Glaukomapatienten Kontraindikationen ergeben können.

Beim **Befunolol**, das zur Zeit als Hydrochlorid in Konzentration von 0,25% und 0,5% als wässrige Augentropfen unter dem Präparatenamen Glauconex[®] in Deutschland erhältlich ist, handelt es sich um einen unspezifischen Betarezeptoren-Blocker mit Wirkungen sowohl auf β_1 - wie auch auf β_2 -Rezeptoren. Glauconex[®] ist zur Therapie von Glaucoma chronicum simplex und zur Behandlung von Sekundärglaukomen postoperativer und vaskulärer Genese zugelassen und wird in der Dauertherapie für gewöhnlich 2 × täglich angewendet.

2.3.2. Entzündliche Erkrankungen des Auges

Bei einer Entzündung handelt es sich um eine das Immunsystem einschließende Reaktion des menschlichen Körpers auf Reize, wie z.B. Mikroorganismen, chemische Substanzen oder Verbrennungen [Vogel und Berke, 1998]. Auch die entzündlichen Erkrankungen des Auges sind durch die fünf klassischen Entzündungszeichen (Rötung, Schwellung, Hitze, Schmerz und gestörte Funktion) gekennzeichnet. Entzündungen haben grundsätzlich positive und lebenserhaltende Funktionen, wie z.B. bei Abwehrreaktion des Körpers gegen Mikroorganismen und Parasiten, doch können Entzündungen auch exzessiv werden und somit zu Schädigungen des Gewebes oder lebensbedrohlichen Fehlfunktionen führen. Eine Entzündung ist durch komplexe Vorgänge unter Beteiligung vieler endogener Substanzen, immunkompetenter Zellen und physiologischer Prozesse gekennzeichnet, woraus die oben angeführten Entzündungssymptome resultieren. Am Auge kann es zu einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen kommen, wobei die verschiedensten Regionen des Auges betroffen sein können, wie z.B. Entzündungen an den Lidern (Kontaktdermatitis), an der Bindehaut (allergische Konjunktivitis), an der Cornea (Keratitis), an der Uvea (Iritis, Uveitis), an der Netzhaut (retinale Vaskulitis), an der Sclera (Scleritis) oder auch am Sehnerv (Neuritis). Da schwere Entzündungen im Auge auch immer das Risiko problematischer und bleibender Augenschäden bergen, die bis zur Erblindung führen können, ist oft eine medikamentöse Therapie angezeigt.

2.3.2.1. Arzneistoffe

Neben der Behandlung der Ursache (z.B. Antibiotikagabe bei bakteriellen Infektionen) steht die Unterdrückung der Entzündungsreaktion im Vordergrund. Zum überwiegenden Teil werden hierzu Antiphlogistika lokal eingesetzt, wobei bei schweren Entzündungen auch mit systemischer Gabe von entzündungshemmenden Mitteln therapiert wird. Man unterteilt die Antiphlogistika grob in Glucocorticoide (z.B. Hydrocortison, Prednisolon, Triamcinolon, Dexamethason) und in nichtsteroidale Antiphlogistika (z.B. Diclofenac, Ketorolac, Indometacin). Hierbei kommt der Gruppe der Glucocorticoide aufgrund ihrer Wirkpotenz die weitaus größere Bedeutung zu, wenngleich ihre Anwendung ernste lokale und systemische Nebenwirkungen einschließt. Für die Glucocorticoide werden zwei Wirkungsmechanismen diskutiert. Zum einen wird durch die Corticoide die Bildung der Proteine Lipocortin und Lipomodulin induziert, welche die Freisetzung von Arachidonsäure und somit die Bildung der entzündungsfördernden Prostaglandine und Leukotriene hemmen. Gleichzeitig unterdrücken sie in hohen Dosen durch Angriff an der Zellmembran die Freisetzung von Prostaglandinen. Des Weiteren scheinen sie die Bildung von Zytokinen zu beeinflussen [Fechner und Teichmann, 2000].

Hydrocortison gehört zu den kurzwirkenden Corticoiden und zeigt im Vergleich zu den synthetischen Vertretern die geringste antientzündliche Wirkung. In Deutschland ist Hydrocortison in Form des Esters Hydrocortisonacetat in Konzentrationen von 1% und 2,5% als Augensalbe unter den Präparatenamen Glycocortison® und Hydrocortison-POS® im Handel und wird zur Behandlung der allergischen Konjunktivitis, Iritis, Iridocyclitis, Uveitis, Chorioretinitis, und bei postoperativen Reizzuständen eingesetzt. Die Applikation erfolgt mehrmals täglich. Bei der lokalen Behandlung mit Hydrocortison ist insbesondere bei längerer Anwendung mit dem Auftreten der für die Corticoid-Behandlung typischen Nebenwirkungen (z.B. induziertes Glaukom, Linsentrübung) zu rechnen.

2.4. Arzneiformen zur Anwendung am Auge

Die Wirkung eines Arzneimittels zur lokalen Anwendung am Auge hängt nicht nur vom Wirkstoff allein, sondern auch von der Arzneiform und der damit verbundenen Verfügbarkeit des Arzneistoffs am Wirkort ab. In der derzeit aktuellen Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs (4. Ausgabe, Grundwerk 2002) sind unter der Monographie Zubereitungen zur Anwendung am Auge – Ophthalmica folgende Darreichungsformen aufgeführt:

- Augentropfen
- Augenbäder
- Pulver für Augentropfen und Pulver für Augenbäder
- Halbfeste Zubereitungen zur Anwendung am Auge
- Augeninserte

Bei **Augentropfen** handelt es sich um sterile, wässrige oder ölige Lösungen oder Suspensionen eines oder mehrerer Wirkstoffe zur tropfenweisen Anwendung am Auge. In der Regel sind Hilfsstoffe enthalten, die Tonizität und/oder Viskosität verbessern und den pH-Wert einstellen oder stabilisieren. Aufgrund der besseren Akzeptanz und Verträglichkeit sowie aus Verfügbarkeitsgründen werden wässrige Augentropfen (z.B. Borocarpin® S Augentropfen, Glauconex® Augentropfen) am häufigsten angewendet. Ölige Augentropfen, die als Grundlage häufig Rizinusöl (z.B. Pilocarpol® Augentropfen) enthalten, werden aufgrund der Sichtbehinderung, genau wie Augensalben, zumeist nachts verwendet.

Neben den flüssigen Augenarzneizubereitungen nehmen **halbfeste Zubereitungen** eine wichtige Stellung in der lokalen Therapie am Auge ein. In erster Linie handelt es sich um Augensalben oder -cremes, insbesondere lipophile kohlenwasserstoffhaltige Grundlagen oder W/O-Emulsionssalben, sowie um wässrige Augengele [Dolder und Skinner, 1990].

Der Vorteil von **Augensalben** (z.B. Spersacarpin® Augensalbe) im Vergleich zu wässrigen Augentropfen liegt in einer prolongierten Wirkung aufgrund einer längeren Verweilzeit am Auge, in einer geringeren systemischen Absorption des Wirkstoffs und in einer allgemein guten Verträglichkeit, wobei eine Sichtstörung aufgrund des Salbenfilms auf dem Auge sich nachteilig auf die Akzeptanz auswirkt.

Wässrige **Augengele** (z.B. Pilogel®), die zumeist Polyacrylate (z.B. Carbomer) als Gelbildner enthalten, nehmen etwa eine Mittelstelle zwischen Augentropfen und Augensalben ein, wobei sich hier positive Eigenschaften beider Arzneiformen vereinigen. Sie setzen den Wirkstoff wesentlich schneller frei als Augensalben [Schoenwald et al., 1978], wobei sie eine vergleichbar gute Verträglichkeit wie die konventionellen Fettgrundlagen aufweisen [Bottari et al., 1978].

Neben den monographierten „klassischen“ Arzneiformen zur Anwendung am Auge wurden in den vergangenen Jahren Entwicklungen verschiedenster Systeme und Methoden beschrieben, deren Ziele unter anderem eine gesteuerte Freisetzung des Arzneistoffes und vor allem eine verbesserte Bioverfügbarkeit sind.

Der verstärkte Einsatz viskositätserhöhender Hilfsstoffe sowie mucoadhäsiver Stoffe [Zignani et al., 1995] zur Erhöhung der Verweildauer am Auge und einer daraus resultierenden Erhöhung der Bioverfügbarkeit wurde ebenso untersucht, wie der Einsatz verschiedenster Hilfsstoffe mit permeationsfördernden Effekten, z.B. Cyclodextrine [Seifert und Keipert, 1997] oder amphiphile Stärke [Baydoun et al., 2002].

Des Weiteren wurden verschiedene Anwendungsformen, wie arzneistoffhaltige Kontaktlinsen [Waltman und Kaufman, 1970; Podos et al., 1972], und insbesondere spezielle galenische Neuerungen zur Steigerung der okulären Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe, wie z.B. Microemulsionen [Haße und Keipert, 1997], Sol-Gel Übergänge [Rozier et al., 1989; Greaves et al., 1992] oder kolloidale Trägersysteme, wie Liposomen [Meisner und Mezei, 1995] oder Nanopartikel [Zimmer und Kreuter, 1995], untersucht.

Um die mehrmals tägliche Applikation bestimmter Arzneistoffe, wie z.B. Pilocarpin, zu vermeiden und die dadurch bedingte erniedrigte Compliance der Patienten zu verbessern sowie zur Erreichung konstanter Kammerwasserspiegel bei gleichzeitiger Vermeidung unerwünschter Wirkungen durch Wirkstoffspiegelspitzen, wurden Drug Delivery Systeme entwickelt, die eine konstante Wirkstofffreigabe über längere Zeit ermöglichen sollen. Neben den gut untersuchten Inserten [Saettone und Salminen, 1995], wobei z.B. mit Ocusert[®] zeitweilig ein Fertigarzneimittel erhältlich war, das über 7 Tage konstant 20 bzw. 40 µg/h Pilocarpin freigibt [Keipert, 1998], beschreibt Papantoniou (1995) eine verzögerte Freisetzung von Pilocarpinhydrochlorid aus inversen Mizellen als ophthalmologische Zubereitung nach applikationsinduzierter Transformation in einen lamellaren Flüssigkristall. Hierbei kommt es durch Kontakt der arzneistoffhaltigen inversen Mizelle mit dem wässrigen Tränenfilm zur Transformation in ein lamellares flüssigkristallines System (Abb. 2.4), aus dem der Arzneistoff verzögert freigegeben wird. Der Einsatz flüssigkristalliner Systeme als Vehikel für eine retardierte Wirkstofffreisetzung wurde in den letzten Jahren vermehrt untersucht und beschrieben. Neben Müller-Goymann und Hamann (1993), die eine verzögerte Wirkstofffreisetzung von Fenopropensäure aus einer Lamellarphase, bestehend aus Lecithin, Wasser und Isopropylmyristat, im Vergleich zu der entsprechenden Lösung in Isopropylmyristat beschrieben, konnte Wilisch (1994) in Permeationsuntersuchungen mit exzidiertem humanen Stratum corneum eine Verringerung des Permeationskoeffizienten von Fenoprofen bei invers hexagonalen Systemen im Vergleich zu einer invers mizellaren Lösung zeigen. Papantoniou (1995) konnte seinerseits bei Permeationsstudien an der exzidierten porcinen Cornea eine Verringerung des Permeationskoeffizienten für Pilocarpinhydrochlorid

durch verzögerte Freisetzung des Arzneistoffs aus dem Flüssigkristall im Vergleich zu wässrigen Lösungen feststellen. Eine gute Übersicht mit weiteren Anwendungsbeispielen von lyotropen Mesophasen im pharmazeutischen Bereich gibt Müller-Goymann (1998).

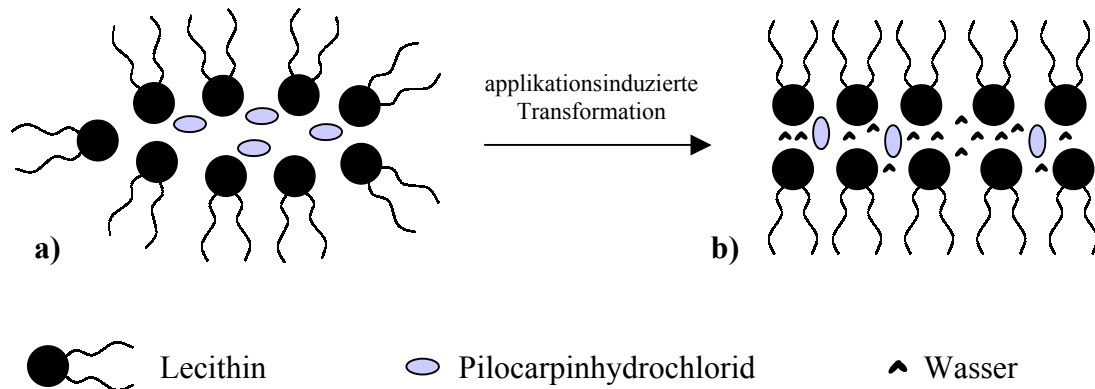


Abbildung 2.4: Modellhafte Darstellung der Arzneistofflokalisierung in der inversen Mizelle **a** und nach Transformation zum lamellaren Flüssigkristall **b** [nach Friedrich, 2000]

2.5. Zellkulturen

Anfang des 20. Jahrhunderts [Harrison, 1907; Carrel, 1912] wurde die Gewebekultur, die sowohl Organkultur als auch Zellkultur umfasst, als Methode entwickelt, die es ermöglicht, das Verhalten von Zellen unabhängig von systemischen Variationen zu studieren. Aufbauend auf den Erkenntnissen mit Primärexplantaten kam es nach 1950 zu einer explosionsartigen Ausdehnung der Zellkultur, die mittlerweile wichtiger Bestandteil naturwissenschaftlicher Forschung sowie Praxis ist [Freshney, 1990]. So werden Zellkulturen heute u.a. zur Produktion antiviraler Impfstoffe, zur Erforschung des Wesens der Neoplasie, zur Entwicklung monoklonaler Antikörper mittels der Hybridomatechnik [Köhler und Milstein, 1975], zur Erforschung der Zellgenetik oder zum Studium zellulärer Wechselwirkungen und intrazellulärer Kontrollmechanismen der Zelldifferenzierung und Entwicklung [Auerbach und Grobstein, 1958; Cox, 1974; Bednarz et al., 1996] genutzt.

Während native Zellen in Kultur eine eher begrenzte Lebensdauer von 20 bis 100 Generationen aufweisen, verbunden mit einem zum Ende hin rasch eintretenden Alterungsprozess und stark verminderter Wachstumsrate, ist es auch möglich, Zellen zu transformieren und so zu immortalisieren. Die Transformation von Zellen erreicht man zumeist durch Transfektion der Zellen mittels Infektion mit SV 40 Viren bzw. Behandlung

der Zellen mit dem entsprechenden SV 40 large-T Antigen Gen [Freshney und Freshney, 1996]. Die wohl interessanteste Eigenschaft transformierter Zellen ist sicherlich in der Immortalisierung, und damit in einer fast unbegrenzten Lebensdauer der Zellen zu sehen. Weiterhin zeigen diese Zelllinien oft eine verstärkte Wachstumsrate verbunden mit einer höheren Sättigungsdichte in Kultur sowie einen geringeren Serumbedarf im Wachstumsmedium. Als nachteilig bei Untersuchungen mit transformierten Zellen ist der im Vergleich zu Normalzellen manchmal verringerte oder veränderte Differenzierungsstatus von Zellen mit speziellen Eigenschaften anzusehen.

Ausgehend von Zellkulturen verschiedenster Herkunft und Differenzierung wurde in den vergangenen Jahren mit sehr unterschiedlicher Zielstellung versucht, durch Rekonstruktion organotypische Äquivalente zu entwickeln, worauf im Abschnitt 2.5.2. eingegangen wird.

2.5.1. Corneale Zellkulturen

Schon zu Beginn der Zellkulturgeschichte wurde versucht, corneale Zellen zu isolieren, wenngleich erst nach Aufkommen der „Antibiotikaära“ und der damit verbundenen Eindämmung von Kontamination mit Mikroorganismen sowie der Entwicklung definierter Nährmedien durch Ringer und Earle um 1943 der Aufschwung der Zellkultur voranschritt. Zum Anlegen von Primärkulturen wurden neben Explantattechniken [Stocker et al., 1958; Adachi und Pollak, 1966] ab Mitte der 60-er Jahre enzymatische Isolierungsmethoden entwickelt [Slick et al., 1965; Mannagh und Irvine, 1965], sowie mechanische Aufbereitungstechniken eingesetzt [Pistsov et al., 1988; Chalabi, 1996]. Neben der Etablierung humaner cornealer Zellkulturen ab Ende der dreißiger Jahre [Thygeson, 1939], konnten corneale Zellen aus verschiedenen Spezies isoliert und kultiviert werden [Fowle und Ormsby, 1955; Sarkar et al., 1966; Bühlow und Ehlers, 1968; Yanoff, 1976; Forbes et al. 1984], wenngleich bis heute bevorzugt corneale Zellen von Kaninchen und Rind für Untersuchungen eingesetzt werden.

2.5.1.1. Corneale Endothelzellen

Nagano beschäftigte sich schon 1914 mit der Isolierung und Kultivierung von Cornea-Endothelzellen. Wenig später wurde von Matsui (1929) die Isolierung und Kultivierung von endothelialen Corneazellen des Kaninchens beschrieben. Vielbeachtet war die von Stocker et al. (1958) erstmalig beschriebene Separierung der einzelnen Schichten der Kaninchencornea

mit anschließender Kultivierung aller drei cornealen Zelltypen. Während von Sallmann et al. (1961) an der Kaninchencornea die bis dahin geltende Vorstellung widerlegten, dass Zellen des normalen Endotheliums keine Mitose zeigen, und Oh (1963) dies bestätigte, konnten Sarkar et al. (1962) sowie Smith et al. (1963) erstmals die Subkultivierung cornealer Endothelzellen zeigen. Nachdem durch Slick et al. (1965) der Einsatz von Enzymen, wie Trypsin, zur Kultivierung von cornealen Endothelzellen des Kaninchens beschrieben wurde, erarbeiteten Mannagh und Irvine (1965) eine Technik zur Kultivierung humaner cornealer Endothelzellen unter Verwendung von Pronase als proteolytisches Enzym. Von da an entwickelten sich die Isolierungsmethoden der Endothelzellen eher weg von der Explantattechnik [Perlman und Baum, 1974; Nayak und Binder, 1984; Yue et al., 1989] und deren Modifikationen [Glassman et al., 1979; Hyldahl et al., 1982] hin zu enzymatischen Behandlungen des Gewebes [McCallum et al., 1982; Easty et al., 1986; Engelmann et al., 1988; Minami et al., 1993; Schneider et al., 1997; Tegtmeier et al., 2001], wobei neben den bereits erwähnten Enzymen Pronase und Trypsin auch Dispase und Kollagenase Anwendung fanden.

Während Perlman und Baum (1974) sowie Baum et al. (1979) die Massenkultur von cornealen Endothelzellen des Kaninchens bzw. des Menschen zum Zwecke biochemischer Untersuchungen beschreiben, wobei Baum et al. weitergehend das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit vom Spenderalter untersuchten, fokussierte sich weiteres Interesse auf Proliferations- und Differenzierungsprozesse von Endothelzellen in Kultur. Tseng et al. (1981) und Gospodarowicz et al. (1981) konnten für bovine corneale Endothelzellen die Synthese und Einlagerung von Fibronectin und Laminin sowie Kollagen vom Typ III, I, IV und V in Kultur beobachten. McCallum et al. (1982) beschrieben für bovine corneale Endothelzellen in Kultur die Ausbildung einer gut organisierten Basalmembran, welche charakteristische Komponenten, wie Laminin, Fibronectin, Kollagen Typ IV, V und III enthielt. Den Einfluss der Wachstumsfaktoren FGF (Fibroblast growth factor) und EGF (Epidermal growth factor) auf Wachstumsverhalten und Differenzierung von bovinen cornealen Endothelzellen in Kultur untersuchten Savion et al. (1982). Bei ihren Untersuchungen zur Isolation und Langzeitkultivierung humaner cornealer Endothelzellen konnte von Pistsov et al. (1988) ebenfalls die Bildung von Laminin, Entaktin und Fibronectin beobachtet werden. Weitreichende Untersuchungen zur Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung sowie Transplantation humaner cornealer Endothelzellen wurden in der Arbeitsgruppe um Engelmann durchgeführt [Engelmann et al., 1988, 1999a,b, 2001; Engelmann und Friedl, 1989, 1995; Böhnke et al., 1999; Bednarz et al., 2001]. Darauf

aufbauend beschrieben Bednarz et al. (2000) die Immortalisierung humaner Endothelzellen, was zu einer vielfach erhöhten Lebensdauer der Zellen in Kultur führte und weiterführende Untersuchungen mit dem humanen Zellmaterial ermöglichte.

Zur Subkultivierung der Endothelzellen in den beschriebenen Untersuchungen wurden oft Wachstumsmedien ähnlicher Zusammensetzung verwendet, wobei Medium 199, Ham's F12-Medium, Minimum essential Medium (MEM) und DMEM die häufigsten Basismedien bildeten, denen Serum verschiedener Spezies in Konzentrationen von 5 bis 20% zugesetzt wurde. Darüber hinaus konnten Bednarz et al. 2001 auch die serumfreie Kultivierung humaner Endothelzellen zeigen.

2.5.1.2. Corneale Epithelzellen

Die Anfänge der Kultur cornealer Epithelzellen wurden von Thygeson (1939) beschrieben, der in seinen Untersuchungen die Kultivierung humaner conjunctivaler und cornealer Epithelzellen betrachtete. Er beobachtete weiterhin die Problematik des Überwachsens der Epithelzellkulturen mit stromalen Zellen (Fibroblasten) bei Verwendung der Explantattechnik, wobei die Fibroblasten später auswuchsen als die Epithelzellen. Fowle und Ormsby (1955) lösten diese Problematik bei ihren Untersuchungen mit Corneae vom Affen und Menschen, indem sie die Explantate vor dem Auswuchs stromaler Zellen entfernten. Sie konnten so reine Kulturen von Epithelzellen erhalten. In folgenden Untersuchungen konnten corneale Epithelzellen unter anderem vom Kaninchen [Stocker et al., 1958; Adachi und Pollack, 1966], Rind [Sarkar et al., 1966], Meerschweinchen [Favata, 1964], von der Ratte [Ellingson und Yao, 1971] und einigen anderen Spezies isoliert und kultiviert werden. Bühlow und Ehlers (1968) beobachteten bei der Isolierung und Kultivierung cornealer Epithelzellen vom Kaninchen und Meerschweinchen mittels Explantattechnik eine starke Proliferation in jungen Kulturen (2-4 Tage nach Explantation) mit Abnahme von Tag 5-10 und einen Wachstumsstillstand nach 2 Wochen in Kultur. Newsome et al. (1974) beschrieben erstmals die Etablierung reiner Kulturen humaner cornealer Epithelzellen, die selbst nach mehrfacher Passagierung (Subkultivierung) weiterhin typische strukturelle Merkmale zeigten. Mit der erfolgreichen Kultivierung der Zellen ergaben sich weitere Möglichkeiten zur Untersuchung des Einflusses von Arzneistoffen und anderen Substanzen auf corneale Epithelzellen. So studierten unter anderem Weimar und Fellman (1970) die Auswirkungen von Chloroquin und Colchicin, Ho et al. (1974) den Einfluss von EGF auf das

Wachstumsverhalten der Zellen sowie Krejci und Harrison (1970a,b) die Zytotoxizität von Neostigmin, Pilocarpin, Carbachol und Epinephrin auf corneale Epithelzellen.

Für die Isolierung von Epithelzellen wurden neben der Explantattechnik auch verschiedenste enzymatische Isolierungsmethoden entwickelt. Vielbeachtet war eine von Gipson und Grill (1982) beschriebene Methode zur Isolierung von intakten Schichten der Kaninchencornea mithilfe von Dispase II und dessen proteolytische Effekte auf die Basalmembran [Spurr und Gipson, 1985]. Eine weitere wichtige Erkenntnis bei der Kultivierung von cornealen Epithelzellen beschrieben Ebato et al. (1987) mit humanen und Egli et al. (1989) mit bovinen Zellen. Sie konnten zeigen, dass Zellen, die aus peripheren Regionen der Cornea isoliert wurden, ein besseres Wachstum in Kultur zeigten und in ihrer Morphologie den Zellen in vivo mehr ähnelten als Zellen, die aus dem zentralen Bereich der Cornea isoliert wurden. Weiterführende Untersuchungen von Ebato et. al (1988) ergaben die höchste Wachstumsrate von cornealen Epithelzellen in Kultur, die aus der Limbusregion der Cornea isoliert wurden. Diese Befunde unterstützen die Ergebnisse von Schermer et al. (1986), die aufgrund ihrer immunocytochemischen Untersuchungen postulierten, dass sich die epithelialen Stammzellen der Cornea im Limbusbereich befinden.

Neben der Kultivierung nativer Epithelzellen wurde in den letzten Jahren die Immortalisierung, insbesondere humaner Epithelzellen, durch Transformation beschrieben [Kahn et al., 1993; Araki-Sasaki et al., 1995; Sharif et al., 1998]. Ihr Nutzen konnte bei Zytotoxizitätsuntersuchungen [Kruszewski et al., 1997; Offord et al., 1999] oder in vitro Permeabilitätsstudien von Substanzen durch epitheliale Schichten [Toropainen et al., 2001] gezeigt werden.

Auch bei der Kultivierung der Epithelzellen wurden verschiedenste Basalmedien als Grundlage des Wachstumsmediums verwendet, wobei vorrangig DMEM oder Ham's F12, beziehungsweise das 1:1 Gemisch, zum Einsatz kamen. Neben der Verwendung von Serum in Konzentration von 5-10% wurden die Medien sehr häufig mit Hormonen und Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, Hydrocortison, Insulin) und Spurenelementen (z.B. Selen) supplementiert. Häufiger als bei der Kultivierung der Endothelzellen wurde bei den Epithelzellen an der erfolgreichen Kultivierung mit serumfreien Medien gearbeitet [Hackworth et al., 1990; Tseng et al. 1996; Castro-Munozledo et al. 1997], deren Vorteil in der Unabhängigkeit von Serum unterschiedlicher und ungewisser Zusammensetzung und damit in einer Standardisierung der Zellkultivierung liegt.

In jüngster Vergangenheit wurden zahlreiche Untersuchungen zur Kultivierung humaner cornealer Epithelzellen auf Amnionmembranen mit dem Ziel der Transplantation bei

insuffizientem Epithelgewebe durchgeführt [Meller und Kruse, 2001; Solomon et al., 2001; Koizumi et al., 2002].

2.5.1.3. Corneale Stromazellen

Das Problem der Überwucherung mit stromalen Zellen (Fibroblasten) bei der Kultivierung von cornealen Epithelzellen mittels Explantattechnik wurde schon früh beschrieben [Thygeson, 1939]. Die Tatsache, dass Fibroblasten gut mithilfe der Explantattechnik zu gewinnen sind, nutzten Stocker et al. (1958), um nach Abtrennung von Epithel- und Endothelgewebe reine Kulturen von stromalen Zellen zu gewinnen. In den folgenden Jahren wurden sowohl Explantattechniken [Adachi und Pollak, 1966; Easty et al., 1986] als auch enzymatische Methoden [Chan und Haschke, 1982; Minami et al., 1993; Schneider et al., 1997] zur Kultivierung von Fibroblasten verwendet.

Während einige Untersuchungen mit kultivierten Fibroblasten zur Synthese von extrazellulären Bestandteilen des Stromas, wie z.B. Kollagen [Yue et al., 1983] oder Glykosaminoglykane [Yue et al., 1978; Bleckmann und Kresse, 1979; Takahashi et al., 2001], in Kultur existieren, beschreiben andere Studien den Einfluss von Fibroblasten auf Wachstum und Differenzierung cornealer Epithelzellen bei Kokultivierung. Tseng et al. (1996) konnten für corneale Epithelzellen des Kaninchens und Pancholi et al. (1998) für humane Epithelzellen eine verstärkte Proliferation in Anwesenheit von Fibroblasten aufzeigen. Selbst eine Kultivierung mit Wachstumsmedium, in dem zuvor Fibroblasten kultiviert wurden, führte zu einer erhöhten Wachstumsrate der epithelialen Zellen.

Generell bereitet die Kultivierung cornealer Fibroblasten aufgrund ihres expansiven Wachstums und geringerer Ansprüche bei Auswahl des Wachstumsmediums weniger Probleme. Fibroblasten führen eher zu Schwierigkeiten bei der Gewinnung reiner Primärkulturen von Epithel und Endothel mithilfe der Explantattechnik, da sie dabei die Primärkulturen überwachsen und so zu Mischkulturen führen können.

Für die Kultivierung der stromalen Zellen wurde in den meisten Untersuchungen vorwiegend DMEM oder Ham's F12 bzw. eine Mischung von beiden eingesetzt, wobei dem Wachstumsmedium Serum in Konzentrationen von 5-10% zugesetzt wurde.

2.5.2. Organotypische Zellkulturmodelle und deren Verwendung

Wie schon in den vorherigen Kapiteln angedeutet, wurde bei der Kultivierung insbesondere der epithelialen Zellen der Einfluss von Medienbestandteilen, kokultivierten Zellen und den

Kultivierungsbedingungen auf Proliferation und Differenzierungsstatus der Zellen deutlich. Darauf aufbauend wurde in den letzten Jahren zunehmend versucht, für verschiedenste Gewebe organotypische Äquivalente zu kultivieren, um einerseits Charakteristika dieser Gewebe auf zellulärer Ebene zu untersuchen und zu verstehen, und andererseits diese Kulturen als in vitro Modelle, z.B. für Toxizitäts- oder Permeationsstudien, zu nutzen. Die wohl häufigsten Untersuchungen auf diesem Gebiet gibt es zur Kultivierung von humanen Hautäquivalenten. Aufbauend auf Untersuchungen von Fusenig et al. (1982) und Prunieras et al. (1983) zur Kultivierung von epidermalen Zellen auf Kollagensubstraten und zur Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze, wurden kultivierte Hautäquivalente beschrieben, die histologisch dem Originalgewebe ähnelten [Régnier et al. 1992; Parenteau, 1994; El-Ghalbzouri et al., 2002] und aufgrund der Ausprägung gewebespezifischer Marker (z.B. Keratine) und Strukturen (z.B. Stratum corneum) als in vitro Modelle eingesetzt wurden [Gay et al., 1992; Specht et al., 1998; Asbill et al., 2000]. Weiterhin weit verbreitet ist die Kultivierung und Verwendung von humanem intestinalen Epithelium. Hierbei wird für Transportstudien von Substanzen durch Zell-Monolayer zumeist die kontinuierliche, gut untersuchte Caco-2 Zelllinie verwendet [Hidalgo und Li, 1996; Nerurkar et al., 1996; Knipp et al., 1997], die aus Zellen eines humanen Kolon-Adenokarzinoms hervorgegangen ist. Neben diesen organotypischen Kulturen sind weitere zahlreiche in vitro Modelle auf Zellkulturbasis beschrieben, wie z.B. von bronchialen und alveolarem Epithelium [Gruenert et al., 1995; Elbert, 1998], buccaler Mucosa [Jacobsen et al., 1995] sowie der Blut-Hirn-Barriere [Franke et al., 2000].

Eine umfassende Übersicht zu Zellkultur-Modellen von biologischen Barrieren als in vitro Testsysteme für Arzneistoffabsorption und -freigabe gibt Lehr (2002).

2.5.3. Zellkulturmodelle der Cornea

Nach den gewonnenen Erkenntnissen zur Kultivierung cornealer Zellen (Abschnitt 2.5.1) wurde ersichtlich, dass eine weitere Annäherung an in vivo Verhältnisse hinsichtlich der Histologie und Differenzierung der Zellen, insbesondere der Epithelzellen, über eine Verbesserung der Kultivierungsbedingungen zu erreichen ist. So konnte beobachtet werden, dass corneale Epithelzellen auf einem Kollagensubstrat [Geggel et al., 1985] eine verbesserte Proliferation und Expression spezifischer cornealer Parameter, wie z.B. Basalmembrankomponenten, zeigten [Friend et al., 1982; He und McCulley, 1991]. Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass durch die Kultivierung von Epithelzellen auf

Kollagensubstrat, in dem wiederum Fibroblasten kultiviert wurden, eine weitere Annäherung an die *in vivo* Verhältnisse erreicht werden konnte. Ohji et al. (1994) konnten den mesenchymalen Einfluss der Fibroblasten bei der Expression von Basalmembran-komponenten während der Kultivierung von humanen cornealen Epithelzellen auf Kollagen zeigen. Parnigotto et al. (1998) entwickelten als Alternative zum Draize-Test ein dreidimensionales Modell von bovinem Stroma und Epithel. Sie konnten die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels mit entsprechenden Zellverbindungen, wie Desmosomen, und die Expression eines 64 kDa Keratins, das als Marker für ein ausdifferenziertes Corneaepithel gilt, beobachten. Germain et al. (1999) konnten humanes Epithelgewebe auf einem Kollagengel, das humane Fibroblasten enthielt, rekonstruieren, wobei auch hier Basalmembrankomponenten, wie Laminin, Fibronectin und bestimmte Integrine, detektierbar waren.

Die vollständige Rekonstruktion der Cornea mit allen drei Gewebeschichten beschrieben erstmalig Minami et al. (1993) mit isolierten bovinen Zellen. Sie entwickelten eine Methode zur Kultivierung der epithelialen Schichten an der Luft-Medium-Grenze und konnten dabei die Ausbildung typischer cornealer Strukturen beobachten. Eine weitere Untersuchung von Zieske et al. (1994) beschreibt ein dreidimensionales Cornea-Konstrukt bestehend aus epithelialen und stromalen Kaninchenzellen sowie einer kontinuierlichen Zelllinie von endothelialen Zellen der Maus. Zieske et al. konnten, anhand schon weiter oben beschriebener typischer cornealer histologischer Parameter, die Bedeutung der besonderen Kultivierungsbedingungen (Luft-Medium-Grenze) und der endothelialen Schicht im Konstrukt auf die Ausbildung typischer cornealer Strukturen zeigen. Auf der weiteren Suche nach einem *in vitro* Modell für toxikologische Untersuchungen als Alternative zum Draize-Test untersuchten Schneider et al. (1997, 1999) die Kultivierung eines dreidimensionalen Corneaäquivalentes bestehend aus isolierten Zellen der porcinen Cornea, wobei sie die verwendeten Zellen aus fetalem Gewebe isolierten. Sie konnten an ihrem Modell, wobei das Äquivalent über die gesamte Kultivierungsperiode submers kultiviert wurde, ebenfalls die Ausbildung von Basalmembrankomponenten sowie von verschiedenen Mukosubstanzen im stromalen Gewebe nachweisen. Griffith et al. (1999) entwickelten erstmals ein komplettes humanes Corneaäquivalent, wobei sie allerdings bei allen drei Zelltypen immortalisierte Zelllinien einsetzten. Dieses Konstrukt zeigte starke Ähnlichkeiten mit dem Originalgewebe hinsichtlich Morphologie, Transparenz, biochemischer Marker sowie Ionen-Transport. Sie beschreiben ihr Gewebeäquivalent als Basis für zukünftige Entwicklungen bezüglich implantierbarer Gewebe. Die Rekonstruktion von komplettem cornealen Gewebe als *in vitro*

Modell für Permeationsstudien mit Arzneistoffen zur ophthalmologischen Anwendung beschrieben Tegtmeier et al. (2001). Tegtmeier (2000) konnte ausgehend von isolierten bovinen Zellen ein Cornea-Konstrukt aufbauen, das histologisch dem Originalgewebe ähnelte und aufgrund seiner Permeationsbarriereigenschaften als Alternative zu Untersuchungen mit exzidierten Hornhäuten einzuordnen ist.

Neben diesem organotypischen dreidimensionalen Cornea-Konstrukt sind in der Literatur einige wenige weitere in vitro Modelle für Permeationsuntersuchungen auf Zellkulturbasis beschrieben, wobei hier ausschließlich Epithelzellen als Permeationsbarriere eingesetzt wurden, die zum Teil mit und auch ohne Fibroblasten bzw. Anheftung an die Luft-Medium-Grenze kultiviert wurden. Den Einsatz von cornealen epithelialen Primärkulturen des Kaninchens als Modell zur Untersuchung der Permeation von Arzneistoffen sowie die Charakterisierung der Kulturen beschrieben Kawazu et al. (1998) sowie Chang et al. (2000). Goskonda et al. (1999) nutzten eine kontinuierliche Zelllinie von Epithelzellen des Kaninchens (SIRC) als in vitro Modell zur Untersuchung der Permeationscharakteristik neuer mydriatischer Substanzen, während Toropainen et al. (2001) mit gutem Erfolg die Verwendung von immortalisierten humanen Epithelzellen als in vitro Modell für okulare Absorptionsuntersuchungen von Arzneistoffen zeigen konnten.

Eine umfassende Beschreibung zum Forschungsstand des Tissue Engineering der humanen Cornea wird von Germain et al. (2000) sowie von Suhonen et al. (2002) zum Einsatz von cornealen epithelialen Zellkulturmodellen für Permeations- und Toxizitätsuntersuchungen gegeben.

2.6. Corneale Absorption von Arzneistoffen

Die Hauptroute für die Absorption von topisch applizierten Arzneistoffen in das Auge ist die Cornea [Donae et al., 1978; Lee und Robinson, 1986]. Durch ihren heterogenen dreischichtigen Aufbau, der auch als Lipid-Wasser-Lipid Wechsel angesehen wird, stellt sie eine besondere Permeationsbarriere dar. Hierbei wird dem lipophilen Epithelgewebe die Hauptbarriereeigenschaft aufgrund der durch zelluläre Verbindungen (tight junctions) bedingten Dichtigkeit des Gewebes zugeschrieben, was auch die steigende Durchlässigkeit der Cornea bei Entfernung des Epithels erklärt [Sieg und Robinson, 1976; Scholz et al., 2002]. Aufgrund der besonderen biophysikalischen Verhältnisse der Cornea permeieren bevorzugt lipophile, nichtionisierte Substanzen mit einem hohen Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten durch die Cornea [Schoenwald, 1990; Malhotra und Majumdar,

2001]. Ein grundsätzlich schlechteres bis gar kein Permeationsvermögen hingegen zeigen stark hydrophile Verbindungen, wobei für Verbindungen mit sehr kleinem Molekulargewicht im Gegensatz dazu eine rasche corneale Permeation beobachtet wurde [Grass und Robinson, 1988a]. Für diese Substanzen (z.B. niedermolekulare Alkohole) wird ein Penetrationsweg über wassergefüllte Poren diskutiert [Grass und Robinson, 1988b; Grass et al., 1988]. Im Falle dissoziierender Stoffe, z.B. Alkaloidsalze wie Pilocarpinhydrochlorid, permeieren bevorzugt die undissoziierten Moleküle (Abbildung 2.5), entsprechend die Base Pilocarpin [Mitra und Mikkelsen, 1988].

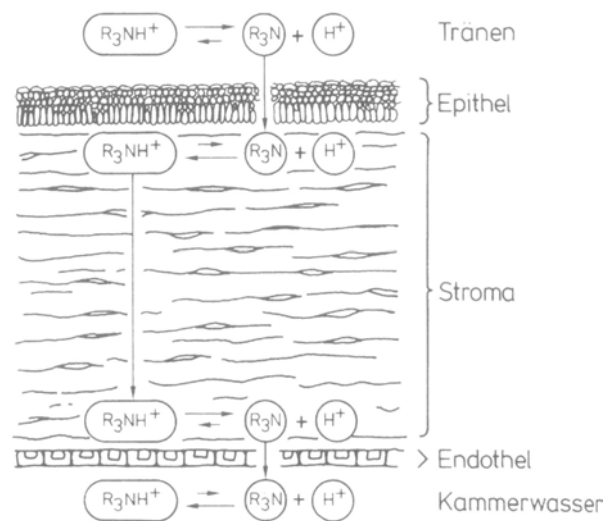


Abbildung 2.5: Modellhafte Darstellung der Permeation von Alkaloidbasen durch die Hornhaut [Kinsey et al., 1983]

Während der substanzspezifische Parameter der Lipophilie/Hydrophilie von Arzneistoffen, zumeist als Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient quantifiziert, oft als eine wichtige Einflussgröße bei der cornealen Permeation beschrieben wird, scheint die Molekülgröße bei niedermolekularen Verbindungen ($M_w < 500 \text{ Da}$), was auf die überwiegende Menge an verfügbaren ophthalmologischen Arzneistoffen zutrifft, eine untergeordnete Bedeutung hinsichtlich des Permeationsvermögens der Substanzen zu haben [Prausnitz und Noonan, 1998; Malhotra und Majumdar, 2001]. Zusätzlich kompliziert wird die Vorhersagbarkeit der cornealen Permeabilität von Arzneistoffen dadurch, dass manche Stoffe sich anscheinend im cornealen Gewebe anreichern [Sieg und Robinson, 1981] oder in der Cornea metabolisiert werden [Deshpande et al., 2000]. Neben den stoffspezifischen gibt es eine Reihe weiterer Einflussgrößen auf die Permeationsgeschwindigkeit von Arzneistoffen durch die Cornea, die

oft durch die eingesetzte Arzneiform bedingt sind. Neben den bereits in Abschnitt 2.4 beschriebenen Möglichkeiten zur Beeinflussung der Bioverfügbarkeit wurden mehrere Untersuchungen zum Einsatz von Permeationsenhancern (Permeationsbeschleuniger) durchgeführt [Tang-Liu et al., 1994; Burgalassi et al., 2001]. Auffallend war hierbei unter anderem die Erhöhung der cornealen Permeabilität durch die Verwendung von quartären Ammoniumsalzen als Konservierungsmitteln. Für die gebräuchlichste Substanz (Benzalkoniumchlorid) wurde in mehreren Studien ein permeationsfördernder Effekt mit unterschiedlichem Ausmaß beschrieben [Tonjum, 1975; Gupta und Majumdar, 1997; van der Bijl et al., 2001].

Die angedeuteten variablen Einflüsse auf die corneale Arzneistoffabsorption machen die Notwendigkeit von in vitro Untersuchungen zum transcornealen Permeationsverhalten von Arzneistoffen in Zubereitungen zur Anwendung am Auge deutlich. Diese Untersuchungen werden zum überwiegenden Teil mit exzidierten Hornhäuten des Kaninchens als standardisiertem Versuchstier durchgeführt, wenngleich die Unterschiede zu den humanen Verhältnissen und damit die Problematik der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen oft kritisch beschrieben wurden [Maurice und Mishima, 1984; Lee und Robinson, 1986]. Somit kommt der Suche nach besseren Alternativen, wie z.B. Zellkulturmodellen (Abschn. 2.5.3), eine besondere Bedeutung zu.

Zur Quantifizierung der Ergebnisse von in vitro Permeationsuntersuchungen kann der Arzneistoffflux J berechnet werden, der sich aus der permeierten Arzneistoffmenge pro Zeit- und Flächeneinheit ergibt [Flynn et al., 1974]. Unter der Voraussetzung von perfect sink-Bedingungen, welche durch Vermeidung des Anstieges der Arzneistoffkonzentration im Akzeptorkompartiment auf Werte von über 10% der Sättigungskonzentration des Arzneistoffes während der Dauer des Permeationsexperimentes zu erreichen sind, sowie der annähernden Konstanz der Ausgangskonzentration C_0 des Arzneistoffes im Donatorkompartiment über die Dauer des Versuches lässt sich der Arzneistoffflux nach Gleichung 2.1 beschreiben.

$$J = P \cdot C_0$$

J = Arzneistoffflux [$\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$]

P = Permeationskoeffizient [cm/s]

C_0 = Ausgangskonzentration im Donator [g/cm^3]

Gleichung 2.1

Der in Gleichung 2.1 enthaltene Permeationskoeffizient P ergibt sich aus dem Verteilungskoeffizienten K , der effektiven Dicke der Permeationsbarriere h sowie dem scheinbaren Diffusionskoeffizienten D_s des Arzneistoffmoleküls im Gewebe (Gleichung 2.2).

$$P = \frac{D_s \cdot K}{h}$$

Gleichung 2.2

Werden die Ergebnisse einer Permeationsuntersuchung graphisch dargestellt, indem man die permeierte Menge an Arzneistoff gegen die Versuchsdauer aufträgt, so lässt sich im steady-state Bereich, welcher sich im linearen Abschnitt des Graphen befindet, der Arzneistoffflux J und unter Berücksichtigung der Ausgangskonzentration C_0 im Donator der Permeationskoeffizient P errechnen (Gleichung 2.3), der als Maß zur Beurteilung der Permeationsbarriereigenschaften von exzidierten Hornhäuten und Zellkulturmodellen herangezogen wird.

$$P = \frac{J}{C_0}$$

Gleichung 2.3

Ist nun der Diffusionskoeffizient des Arzneistoffmoleküls im Arzneimittel größer als der entsprechende Permeationskoeffizient in der Cornea, wie es für die häufigsten Anwendungen, z.B. für wässrige Lösungen, zu erwarten ist, so ist die Permeation des Arzneistoffes durch die Cornea der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Wird jedoch die Geschwindigkeit durch die Freisetzung des Arzneistoffs aus der Formulierung bestimmt, so scheint die Zubereitung potentiell geeignet, den Wirkstofftransport gezielt steuern zu können, z.B. Ocusert[®] (Abschnitt 2.4).

3 Material und Methoden

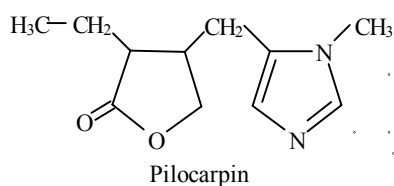
3.1. Material

3.1.1. Biologisches Material

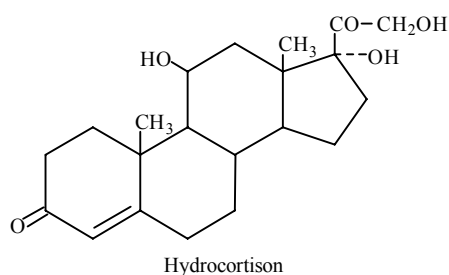
Schwein: Zur Gewinnung der Primärkulturen aus cornealem Gewebe wurden die enukleierten Augen frisch geschlachteter Versuchstiere der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in D-Braunschweig mit einem durchschnittlichen Schlachtgewicht von 110-120 kg verwendet. Die Augen wurden direkt nach der Tötung der Tiere entnommen und zur Erhaltung der Gewebeeigenschaften in einer feuchten Kammer transportiert. Zur Zellisolierung wurden die Corneae herauspräpariert und in sterilem calcium- und magnesiumfreien salinischen Phosphatpuffer pH 7,4 PBS (ICN, D-Eschwege) aufbewahrt.

Human: Sclerale Ringe mit Resten von cornealem Gewebe, die von humanen Spenderhornhäuten nach Transplantationsoperationen zurückbleiben, wurden freundlicherweise von der Augenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Das Alter der Spender betrug 47-74 Jahre. Zur Zellisolierung, im Durchschnitt 21-33 Tage nach Bulbusentfernung, wurde Gewebe von männlichen als auch weiblichen Spendern verwendet.

3.1.2. Arzneistoffe

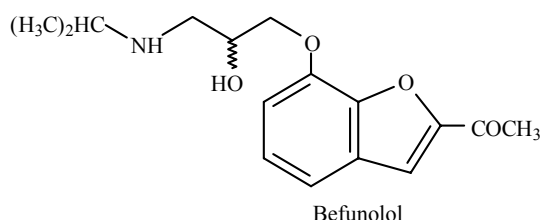


Pilocarpin: Pilocarpin (M_r 208,2) ist das Hauptalkaloid des südamerikanischen Jaborandi-Baumes (*Pilocarpus jaborandi*) und wird aus dessen Blättern isoliert. Als direktes Parasympathomimetikum findet es in der Ophthalmologie hauptsächlich bei der Behandlung des Glaukoms Anwendung. Eingesetzt in Zubereitungen zur Anwendung am Auge werden sowohl die Base als auch verschiedene Salze des Pilocarpins. Für die Untersuchungen wurden sowohl die Base, freundlicherweise von der Firma Dr. Mann Pharma (D-Berlin) zur Verfügung gestellt, als auch das Pilocarpinhydrochlorid (PHCl) (M_r 244,7), welches von der Firma Synopharm (D-Barsbüttel) in Arzneibuchqualität DAB 1996 erhältlich war, verwendet.



Hydrocortison : Das Corticosteroid Hydrocortison (HC) (M_r 362,5) sowie sein Ester Hydrocortisonacetat werden in der Ophthalmologie aufgrund ihrer antiphlogistischen und antiallergischen Wirkung, oft auch in Kombination mit Antibiotika, therapeutisch genutzt. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit

findet man sie eher als Suspensions-Augentropfen oder -augensalben mit einem Wirkstoffgehalt von 0,5-2,5%. In den Untersuchungen wurde die wässrige Lösung des Hydrocortisons, das in Arzneibuchqualität Ph.Eur.Ntr.2000 von der Firma Caelo (D-Hilden) verfügbar war, eingesetzt.



Befunolol: Bei Befunolol (M_r 291,35) handelt es sich um einen unspezifischen Betarezeptoren-Blocker, der zur Behandlung des Glaukoms eingesetzt wird. In Deutschland ist die 0,25/0,5%ige Lösung von Befunololhydrochlorid

(BHCl) als Glauconex[®] im Handel. Diese Substanz wurde freundlicherweise von der Firma Alcon Pharma (D-Freiburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.3. Rezepturgrundstoffe

Polyacrylsäure: Die Polyacrylsäure ist ein vielseitig eingesetzter, viskositätserhöhender Hilfsstoff, der in wässriger Lösung bei Neutralisation ein transparentes Gel bildet. Verwendet wurde das handelsübliche Carbopol[®] 940 (Caelo).

Emulgierende Augensalbe Ph.Helv.8-1997: Diese Augensalbe gehört zu den wasseraufnehmenden Absorptionsgrundlagen und wurde gemäß des Arzneibuchs hergestellt. Sie enthält 10 Teile Wollwachs (Caelo), 35 Teile dickflüssiges Paraffin (Merkur, D-Hamburg) und 55 Teile weißes Vaseline (Merkur).

Isopropylmyristat: Isopropylmyristat (IPM) ist ein chemisch stabiles und in Wasser praktisch unlösliches, flüssiges Wachs. Es wird aufgrund seines guten Spreitungsvermögens oft als Lösungsmittel in Salben und Emulsionen eingesetzt. IPM war von der Firma Henkel (D-Düsseldorf) erhältlich.

Lecithin: Lecithin ist natürlichen Ursprungs, gehört zur Gruppe der Phospholipide und wird aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften zur Stabilisierung von Emulsionen genutzt. Das eingesetzte Phospholipon 90G ($M_r \approx 800$) ist ein hochgereinigtes Sojalecithin mit einem Gehalt an Phosphatidylcholin von mindestens 90% und wurde freundlicherweise von der Firma Rhone Poulenc Rorer Nattermann (D-Köln) zur Verfügung gestellt.

Wasser: Wasser wurde in bidestillierter Qualität verwendet.

3.1.4. Ophthalmika

Für die Permeationsuntersuchungen wurden die Modellarzneistoffe Pilocarpinhydrochlorid, Hydrocortison und Befunololhydrochlorid in ausgewählten Formulierungen als Donorsysteme eingesetzt. Dabei wurden sowohl Fertigarzneimittel (3.1.4.1.) als auch selbst hergestellte Formulierungen (3.1.4.2.) verwendet.

3.1.4.1. Fertigarzneimittel

Die verwendeten Fertigarzneimittel sind in Tabelle 3.1 in ihrer Zusammensetzung gegenübergestellt.

Präparat	Formulierung	Inhalt (1g enthält ...)
Borocarpin [®] S 2%	Wässrige Lösung	20 mg Pilocarpinhydrochlorid, 0,1 mg Benzalkoniumchlorid, Natriumchlorid, Wasser für Injektionszwecke
Pilogel [®] 4%	Wässriges Gel	40 mg Pilocarpinhydrochlorid, 0,088 mg Benzalkoniumchlorid, Carbomer, Natrium-EDTA, Gereinigtes Wasser
Pilocarpol [®] 2%	Ölige Lösung	20 mg Pilocarpin, 0,002 mg Cetalkoniumchlorid, Rizinusöl
Spersacarpin [®] 2%	W/O-Emulsionssalbe	20 mg Pilocarpinhydrochlorid, Cetylstearylalkohol, weißes Vaseline, Wollwachs, dickflüssiges Paraffin, Wasser f. Injekt.
Glauconex [®] 0,5%	Wässrige Lösung	5 mg Befunololhydrochlorid, 0,07 mg Benzalkoniumchlorid, Polyvinylalkohol, NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , Wasser f. Injekt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Fertigarzneimittel (Fachinformation des Herstellers)

3.1.4.2. Weitere Formulierungen

Neben den Fertigarzneimitteln wurden für die Permeationsuntersuchungen weitere wirkstoffhaltige Formulierungen eingesetzt. Einen Überblick über die Systeme gibt Tabelle 3.2.

PHCl 2% OK: Hierbei handelt es sich um eine 2%ige wässrige Lösung von Pilocarpinhydrochlorid ohne Konservierungsstoffe, die mit Natriumchlorid (Merck, D-Darmstadt) isotonisiert und anschließend sterilfiltriert wurde.

HC 0,02% OK: Hydrocortison wurde in einer Konzentration von 0,02% in Wasser gelöst, die Lösung mit 0,1 M HCl (Merck) auf pH 5 eingestellt, mit Natriumchlorid isotonisiert und sterilfiltriert.

IML 2%: Bei dieser Formulierung handelt es sich um eine invers mizellare Lösung (IML), die sich aus Lecithin und IPM zusammensetzt, und die zu 2% Pilocarpinhydrochlorid enthält. Das Lecithin wurde bei 60 °C in IPM gelöst, wobei eine leicht gelbe Lösung erhalten wurde, die 30% Lecithin enthielt. PHCl wurde in einer ausreichenden Menge Wasser (ca. 1:1) gelöst und in die IML unter Rühren eingearbeitet. Dabei kam es teilweise zur Transformation der IML zum lamellaren Flüssigkristall. Unter ständigem Rühren und Erwärmen der Lösung wurde das Wasser entfernt und die Lösung klar [Papantoniou, 1995].

BHCl-AG 1%: Entsprechend dem Fertigarzneimittel Pilogel® wurde hier ein Hydrogel als Grundlage gewählt. Dieses Augengel (AG) enthält 1% Befunololhydrochlorid sowie 3,5% Polyacrylsäure und wurde mit Natriumhydroxid-Lösung 5% (Merck) auf pH 7 eingestellt. Die Zubereitung wurde ohne Konservierungsmittel jeweils frisch hergestellt.

BHCl-AS 2%: Diese Augensalbe (AS) enthält 2% Befunololhydrochlorid, welches in Wasser gelöst in Emulgierende Augensalbe Ph.Helv.8-1997 eingearbeitet wurde. Die Formulierung ist dem Fertigarzneimittel Spersacarpin® Augensalbe nachempfunden.

Bezeichnung	Formulierung	Inhalt (1g enthält ...)
PHCl 2% OK	Wässrige Lösung	20 mg Pilocarpinhydrochlorid, Natriumchlorid, Wasser
HC 0,02% OK	Wässrige Lösung	0,2 mg Hydrocortison, Natriumchlorid, Salzsäure, Wasser
IML 2%	Invers mizellare Lösung	20 mg Pilocarpinhydrochlorid, Lecithin, Isopropylmyristat
BHCl-AG 1%	Wässriges Gel	10 mg Befunololhydrochlorid, Carbopol [®] 940, Natriumhydroxid, Wasser
BHCl-AS 2%	W/O-Emulsionssalbe	20 mg Befunololhydrochlorid, Emulgierende Augensalbe Ph.Helv.8-1997, Wasser

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der selbst hergestellten Ophthalmika

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkulturen

Alle Arbeiten zur Isolierung bzw. zur Kultivierung der Zellen wurden unter einer Laminar-Air-Flow Werkbank (Heraeus Instruments, D-Hanau) durchgeführt. Die benutzten Geräte wurden zuvor hitzesterilisiert bzw. autoklaviert. Verwendete Einmalartikel wurden steril bezogen. Alle sonstigen Medien, Medienbestandteile, Pufferlösungen etc. wurden zuvor sterilisiert bzw. steril bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator (Heraeus) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5% in Kulturgefäßen aus Polystyrol.

3.2.1.1. Porcine Zellkulturen

3.2.1.1.1. Zellisolierung und Anlegen von Primärkulturen

3.2.1.1.1.1. Präparierung der Cornea

Die entnommenen Augen der frisch geschlachteten Schweine wurden mit Wasser gereinigt und anhaftendes Fremdgewebe entfernt. Anschließend wurde die Cornea mit einem 1-2 mm breiten scleralen Ring herauspräpariert, in PBS gespült und bis zur weiteren Isolierung der

Zellen in PBS mit einem 2%igen Antibiotika/Antimykotika-Zusatz (Gibco BRL Life Technologies, D-Karlsruhe) aufbewahrt.

3.2.1.1.1.2. Cornea-Endothelzellen

Zur Gewinnung der Zellen wurde das endotheliale Gewebe mit einer Trypsin 0,5 g/l – EDTA 0,2 g/l – Lösung (Gibco BRL Life Technologies) behandelt und für ca. 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Gewebedissoziation konnten die Zellen mit einem Silikonspatel von der Descemet-Membran gelöst, durch leichtes Pipettieren vereinzelt und in eine 25 cm² Kulturflasche (Costar, D-Fernwald) ausgesät werden (Abbildung 3.1). Die Zellen wuchsen konfluent und konnten nach ca. 7 Tagen passagiert werden.

3.2.1.1.1.3. Cornea-Stromazellen

Um Fibroblasten zu erhalten, wurde das Epithel und das Endothel mithilfe eines Skalpells vollständig entfernt. Das stromale Gewebe wurde in 3-4 mm große Stücke geschnitten, die sich bei 37 °C für 30 min auf einer 100 mm Durchmesser Petrischale (Costar) anhefteten und danach mit Kulturmedium überschichtet wurden. Aus diesen Explantaten wuchsen die Fibroblasten nach etwa 6-7 Tagen aus.

3.2.1.1.1.4. Cornea-Epithelzellen

Um ein Adhären und das Wachstum der epithelialen Zellen zu verbessern, wurden die Kulturgefäße zur Primärkultivierung zuvor mit aus Rattenschwanzsehnen isoliertem Kollagen Typ I (Abschnitt 3.2.2.1.) beschichtet. Dazu wurde das Kulturgefäß mit 0,08%iger essigsaurer Kollagenlösung benetzt, für 3 h bei 37°C inkubiert, abgesaugt und 3 mal mit PBS gewaschen. Die Gefäße wurden sofort verwendet. Zur Gewinnung der Epithelzellen wurde die Cornea für 24 h in Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem PBS bei 4 °C aufbewahrt, das Endothel vollständig mechanisch entfernt und das Gewebestück mit 1,8 U/ml Dispase II (Roche Diagnostics, D-Mannheim) bei 37 °C für 150 min inkubiert. Es wurde zweimal mit PBS gewaschen und intakte Epithelfragmente mithilfe eines Skalpells und Pinzette von der Basalmembran abgenommen, mit PBS gewaschen und durch heftiges Pipettieren mit einer Pasteurpipette in einzelne Zellen und Zellcluster aufgeschlossen. Diese wurden in die beschichtete 35 mm Petrischale (Costar) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

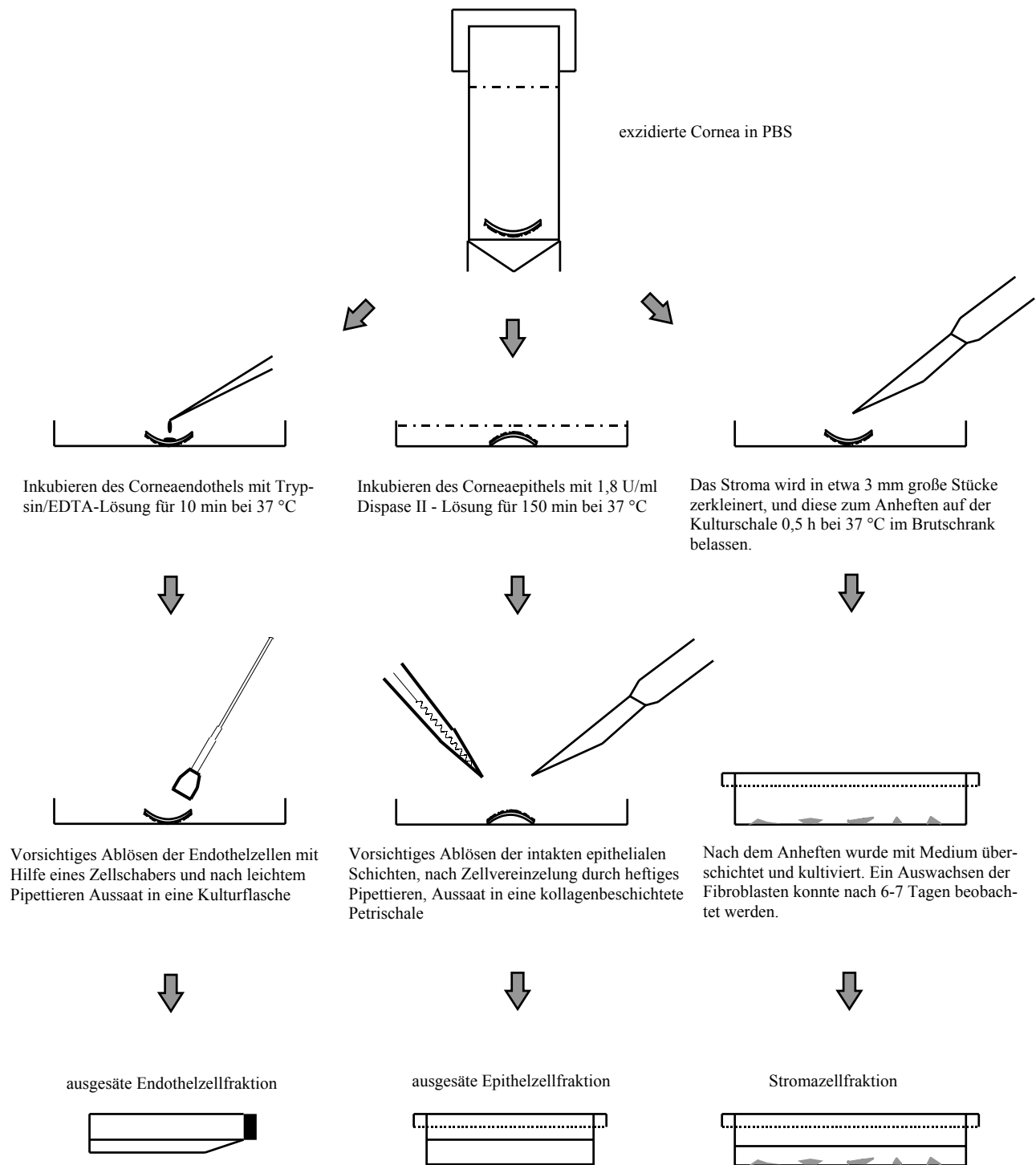


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung zur Primärkultivierung der cornealen Zelltypen

3.2.1.2. Kultivierung und Subkultivierung

Alle drei Zelltypen wurden mit dem gleichen Wachstumsmedium kultiviert. Verwendet wurde Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM (ICN), das mit 10% Neugeborenen Kälberserum NBCS, 4 mM L-Glutamin sowie 1% einer Antibiotika/Antimykotika-Lösung (Gibco BRL Life Technologies) supplementiert war. Daraus ergaben sich Konzentrationen von 100 U/ml Penicillin G Natriumsalz, 100 µg/ml Streptomycinsulfat und 0,25 µg/ml Amphotericin B. Ein Mediumwechsel wurde dreimal pro Woche durchgeführt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz mit PBS gewaschen und für 5-8 min mit Trypsin 0,5 g/l – EDTA 0,2 g/l – Lösung bei 37 °C inkubiert. Der Prozess wurde mit serumhaltigen Medium gestoppt, mögliche Zellcluster durch heftiges Pipettieren gut vereinzelt, und die Zellen in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:6 in neue 25 cm² oder 75 cm² Zellkulturflaschen (Costar) überführt.

3.2.1.3. Kryokonservierung und Aussaat-effizienz

Um eine Alterung oder Verlust der Zellen zu vermeiden, ist es nötig, durch Kryokonservierung einen Stammvorrat an Zellen anzulegen, um sie bei Bedarf wieder aufzutauen. Zu diesem Zweck wurden $1-1,5 \cdot 10^6$ Corneazellen in 1ml Gefriermedium, das aus DMEM Wachstumsmedium und 10% Dimethylsulfoxid DMSO (Sigma, D-Deisenhofen) als Kryoprotektivum bestand, suspendiert und eingefroren. Die Zellsuspension wurde 2h in der Gasphase über flüssigen Stickstoff gehalten, danach in die flüssige Phase (-196 °C) abgesenkt und dort gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in warmem Wasser zügig erwärmt und langsam in 25 ml Medium suspendiert. Nach dem Anheften der Zellen wurde das Medium gewechselt, um Reste des toxischen DMSO zu entfernen.

Um die Überlebensfähigkeit nach Kryokonservierung und das Anheftungsvermögen der Zellen zu ermitteln, ist es möglich, die Aussaat-effizienz der einzelnen Zelltypen zu bestimmen. Hierzu wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die sich 10 h nach dem Auftauen angeheftet haben. Die Aussaat-effizienz ergibt sich dann als Quotient aus der Anzahl angehefteter und der Anzahl der aufgetauten Zellen (Gleichung 3.1).

Gleichung 3.1:
$$\frac{\text{Anzahl adhärenter Zellen}}{\text{Anzahl aufgetauter Zellen}} \times 100 = \text{Aussaat-effizienz} [\%]$$

3.2.1.4. Mikroskopie

In der Routinekultivierung der Zellen wurde zur lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellmorphologie ein inverses Phasenkontrastmikroskop ID03 (Zeiss, D-Oberkochen) genutzt. Zur weiteren Betrachtung und graphischen Dokumentation wurden sowohl ein Mikroskop Standard RA (Zeiss) mit Phasenkontrast- und Photoeinrichtung sowie ein Umkehrmikroskop Olympus IX50 (Olympus, D-Hamburg) mit Phasenkontrasteinrichtung und digitaler Bildaufnahme sowie Bildbearbeitung Analysis[®] (Soft Imaging System, D-Münster) eingesetzt.

3.2.1.5. Immuncytochemische Untersuchungen

Zur Charakterisierung der verschiedenen Corneazellen hinsichtlich ihrer zelltypischen Intermediärfilamente (Cytokeratin, Vimentin) wurden die Zellen in speziellen Kulturgefäßen, Lab Tek[®] Chamber Slide (Nunc, D-Wiesbaden), kultiviert. Die Untersuchungen zum Nachweis von Cytokeratin wurden mit einem monoklonalen pan-Cytokeratin clone C11 (Ms-IgG₁) Antikörper (Biotrend, D-Köln), der die Keratine in allen einfachen epithelialen Zellen detektiert, in einer Verdünnung von 1:100 durchgeführt. Bei der Bestimmung von Vimentin wurde ein monoklonaler Anti-Vimentin clone V9 (Ms-IgG₁) Antikörper (Sigma), 1:40 verdünnt, als primärer Antikörper eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte mit einer wässrigen Lösung von 1% Triton X-100 (ICN), welches die Membrandurchlässigkeit erhöht. Als sekundärer Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Anti-Maus (Gt-IgG) Antikörper (Sigma) in einer wässrigen Verdünnung von 1:50 verwendet. Die Detektion erfolgte mittels einer Diaminobenzidin (DAB)-Farbreaktion als braunes Farbpräzipitat. Hierbei wurde Sigma Fast[®] DAB (Sigma) eingesetzt, das 1,6 mg/ml Carbamidperoxid als Substrat und 0,7 mg/ml DAB als Farbkomponente enthält.

Corneazellen der 3. Passage wurden zu 50.000 Zellen je Kammer ausgesät und 24 h kultiviert. Nach Fixierung mit -20 °C kaltem Methanol für 20 Minuten wurden die Kulturen zweimal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen mit 10% NBCS in PBS für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit PBS bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit dem primären Antikörper für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Danach folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS. Die Zellen wurden nun mit dem sekundären Antikörper wieder für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert

und danach dreimal mit PBS gewaschen. Sodann wurde für 5 Minuten mit Sigma Fast® DAB inkubiert. Ein positiver Nachweis war an einer dunkelbraunen Färbung der Kulturen zu erkennen. Keine Färbung zeigte die Abwesenheit der zu detektierenden Intermediärfilamente an.

3.2.1.6. Wachstumsverhalten der Corneazellen

Um das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zellen zu charakterisieren, wurden Wachstumskurven aufgenommen. Anhand dieser sigmoiden Kurven lassen sich typische Parameter wie Latenz-Phase (lag-Phase), Populationsverdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase und die Sättigungsdichte der Zellen in der Plateau-Phase ermitteln.

Im Falle der Endothel- und Epithelzellen wurden 5.000 bzw. 7.000 Zellen/cm² in eine 25 cm² Kulturflasche ausgesät und bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert. Das Wachstumsverhalten wurde alle 24 h mittels digitaler Fototechnik dokumentiert (Abschnitt 3.2.1.4.) und mithilfe der Analysis® Bildanalyse quantitativ ausgewertet.

Bei der Bestimmung des Wachstumsverhalten der Fibroblasten wurden 6.000 Zellen/cm² in 24er Zellkulturplatten ausgesät. Zur Auszählung wurden die Zellen, wie unter 3.2.1.2. beschrieben, abgelöst und durch kräftiges Pipettieren gut vereinzelt. Die Zellzahl konnte mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

3.2.1.7. Humane Zellkulturen

3.2.1.7.1. Immortalisierte humane Epithelzellen – CEPI 17 CL 4

Bei den eingesetzten humanen Epithelzellen handelt es sich um die immortalisierte Zelllinie CEPI 17 CL 4, die freundlicherweise von der Firma NESTEC (Nestle Research Center, CH-Lausanne) zur Verfügung gestellt wurde. Nach Primärkultivierung der cornealen Epithelzellen durch Dispase-Behandlung der Spenderhornhaut einer 73 jährigen Frau erfolgte die Immortalisierung der Zellen durch Behandlung mit einem rekombinanten SV (Simian Virus) 40 T Antigen retroviralen Vector. Später erfolgte eine Klonierung der Zellpopulation mit dem besten Zellwachstum [Offord et al., 1999].

Die Zelllinie wurde ab Passage 29 zur Verfügung gestellt und zur Etablierung eines eigenen Zellvorrates nach beschriebener Methode mit einem serumfreien low-calcium Medium NRM-Serum Free Media supplementiert mit 30 µg/ml Rinderhypophysenextrakt, 10 µg/ml

Transferrin (Biofluids, BioSource International, B-Nivelles), 5 µg/ml Insulin, 1,4 µM Hydrocortison, 1 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor EGF (Biochrom, D-Berlin) und 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung entsprechend 100 U/ml Penicillin G Natriumsalz, 100 µg/ml Streptomycinsulfat und 0,25 µg/ml Amphotericin B in Kulturflaschen, die vorher für 24 h mit einer wässrigen Lösung von 0,1% Gelatine Typ A (Sigma) bei 37 °C beschichtet worden waren, kultiviert. Für die gemeinsame Kultivierung aller drei Zellarten der Cornea in einem Konstrukt wurden die CEPI-Zellen langsam und schrittweise an ein serumhaltiges Wachstumsmedium adaptiert. Als Wachstumsmedium zur weiteren Standardkultivierung der CEPI-Zellen kam hierbei ein 1:1 Gemisch von DMEM und Ham's F-12 (Gibco BRL Life Technologies) supplementiert mit 5% fetalem Kälberserum FKS, 5 µg/ml Insulin, 1,4 µM Hydrocortison, 1 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor EGF (Biochrom), 10 µg/ml Transferrin (Biofluids), 2 mM L-Glutamin, und 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung (Gibco BRL Life Technologies) zum Einsatz. Die CEPI-Zellen konnten ebenfalls, wie in 3.2.1.2. und 3.2.1.3. beschrieben, subkultiviert und kryokonserviert werden.

3.2.1.7.2. Immortalisierte humane Endothelzellen – HENC

Bei den hier verwendeten humanen Endothelzellen handelt es sich ebenfalls um eine immortalisierte Zelllinie, die freundlicherweise von der Augenklinik des Uniklinikums Eppendorf in D-Hamburg zur Verfügung gestellt wurde. Nach einer von Engelmann et al. (1988) beschriebenen Methode wurde eine Primärkultur humaner cornealer Endothelzellen ausgehend von der Hornhaut eines 91-jährigen Spenders gewonnen. Die Immortalisierung der Zellen erfolgte durch SV 40 Transfektion mittels Elektroporation [Bednarz et al., 2000].

Die Zellen wurden ab Passage 50 zur Verfügung gestellt und in einem F99 Wachstumsmedium kultiviert. Hierbei handelt es sich um eine 1:1 Mischung von Ham's F12 und Medium 199 (Gibco BRL Life Technologies), die mit 5% FKS und 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung supplementiert war. Auch diese Zelllinie wurde, wie unter 3.2.1.2. und 3.2.1.3. beschrieben, subkultiviert und kryokonserviert.

3.2.1.7.3. Native humane Fibroblasten

Analog zu der in 3.2.1.1.3. beschriebenen Methode wurden auch die humanen Fibroblasten isoliert. Ausgehend von scleralen Ringen mit anhaftendem cornealen Gewebe wurde mithilfe von Skalpell und Pinzette reines Stromagewebe freigelegt und in 2-3 mm große Stücke

geschnitten. Die humanen Fibroblasten wurden ebenfalls durch die beschriebene Explantattechnik isoliert und weiter in Medium Ready-Mix (PAA Laboratories, A-Linz), welches aus DMEM mit 10% FKS, 4mM L-Glutamin und 1% Antibiotika/Antimykotika zusammengesetzt war, kultiviert.

3.2.2. Aufbau des organotypischen Cornea-Konstruktes

3.2.2.1. Präparation des Rattenschwanzkollagens

Das für die Konstruktherstellung benötigte Kollagen wurde durch saure Extraktion aus Rattenschwanzsehnen gewonnen. Aus den Rattenschwänzen konnten nach einminütigem Einlegen in Ethanol 70% die Sehnen durch Knicken der Schwanzspitze leicht herausgezogen werden [Freshney, 1990]. Die Sehnen von 10 Rattenschwänzen wurden nach Zerkleinerung mit einem Skalpell in 1000 ml Essigsäure 3% unter Rühren gelöst. Ungelöste Bestandteile konnten über die Filtration durch Mull entfernt werden. Die Lösung wurde sodann für weitere 24 Stunden gegen 4000 ml Essigsäure 0,5% unter Verwendung der Dialysemembran Spectropore MWCO 6000-8000 (Spectrum Medical Industries, USA-Los Angeles) dialysiert und anschließend in Aliquoten lyophilisiert. Zum Gebrauch wurde das Lyophilisat in Essigsäure 0,05% zu der gewünschten Konzentration gelöst.

Die Zusammensetzung des so extrahierten Kollagens wurde in einer früheren Untersuchung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt und ergab, dass überwiegend Kollagen Typ I extrahiert wurde [Boozchaloo und Reichl, 1996].

3.2.2.2. Porcines Cornea-Konstrukt

Der Aufbau des Corneaäquivalentes erfolgte schrittweise in Transwell® Einsätzen (Costar) für Sixwell-Kulturplatten (Abbildung 3.2). Sie besitzen eine Polycarbonat-Membran mit einer Porengröße von 3,0 µm und einem Durchmesser von 24 mm. Dieser spezielle Einsatz ermöglicht sowohl eine submerse Kultivierung von Zellen als auch ein Wachstum der Zellen an der Luft-Medium-Grenze.

Die Polycarbonatmembran wurde mit einem zellfreien Kollagengel beschichtet. Dazu wurden pro Transwell® 1,0 ml einer Kollagenlösung mit einem Kollagengehalt von 1,6 mg/ml mit 0,3 ml einer Gelvormischung versetzt. 14 ml dieser Gelvormischung enthalten 5,5 ml 10×MEM Minimal essential medium (ICN), 0,5 ml L-Glutamin, 6,25 ml NBCS, 1,75 ml einer

NaHCO₃-Lösung 71,2 mg/ml (Sigma). Durch den Zusatz der Vormischung kommt es zur Neutralisierung der essigsauren Kollagenlösung und damit zu einer Erstarrung des Kollagens. Dieses Bodengel wurde vor dem Aufsäen der Endothelzellen mit 1ml DMEM Wachstumsmedium gewaschen. Zur Rekonstruktion des Endothels wurde eine subkonfluente Kulturflasche an Endothelzellen trypsinisiert, die Zellsuspension auf $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt und 1ml dieser Suspension gleichmäßig auf das Bodengel pipettiert. Nach 2 h im Inkubator bei 37 °C wurden weitere 4 ml DMEM Wachstumsmedium hinzugefügt, und das Endothel für 7 Tage kultiviert. Während dieser Zeit kam es zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers. Zur Herstellung der Stroma-Biomatrix wurden pro Well $2 \cdot 10^5$ trypsinisierte und abzentrifugierte Fibroblasten in 280 µl DMEM Wachstumsmedium aufgenommen, in weiteren 777 µl Gelvormischung suspendiert, diese Suspension mit 2,57 ml Kollagenlösung (1,6 mg/ml) gut gemischt und zügig auf das Endotheläquivalent aufgebracht. Innerhalb weniger Minuten kam es zur Erstarrung des Kollagengels. Nach 2 h wurde das Endothel-Stromaäquivalent mit einem Spatel von der Wandung des Transwells[®] gelöst, wiederum 5 ml DMEM Wachstumsmedium hinzugefügt und für weitere 5-7 Tage kultiviert. In dieser Zeit kommt es zu einer Kontraktion des Kollagengels, was auf das Vorhandensein und die Lebensfähigkeit der stromalen Zellen zurückzuführen ist. Zur Rekonstruktion von Epithelgewebe wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen einer Suspension von trypsinisierten Epithelzellen abzentrifugiert, in 50-70 µl DMEM Wachstumsmedium aufgenommen und vorsichtig auf das kontrahierte Kollagengel pipettiert. Zur Anheftung der Zellen wurde das Konstrukt für 1 h im Inkubator bei 37 °C belassen und danach 5 ml DMEM Wachstumsmedium hinzugefügt. Das Gewebeäquivalent wurde so bis zur Konfluenz einer Epithelzellschicht für weitere 7 Tage kultiviert.

Zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels war es nötig, das Konstrukt an der Grenzfläche zwischen Medium und Luftumgebung zu kultivieren. Zu diesem Zweck wurden die Transwell[®] Einsätze mit einer Metallplatte angehoben. So war es möglich, das Konstrukt mit 4 ml Medium zu unterschichten und nur durch Diffusion der Nährstoffe von unten zu kultivieren, während das Epithelgewebe Kontakt zur Luftumgebung hatte. Für die weitere Kultivierung wurde ein Minimal Supplemented Basal Medium (MSBM) genutzt, das aus einer 3:1 Mischung von DMEM und Ham's F-12 bestand, die mit 2% NBCS, 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung, 4 mM L-Glutamin (Gibco BRL Life Technologies), 5 µg/ml Insulin, 0,4 µg/ml Hydrocortison, 20 pM Triiodthyronin, 5 µg/ml Transferrin, 24,3 µg/ml Adenin (Sigma), 6,1 µg/ml Ethanolamin, 14,1 µg/ml Phosphoethanolamin (Biochrom), 6,8 ng/ml Selenige Säure (Aldrich, D-Steinheim) supplementiert war. Das Konstrukt wurde

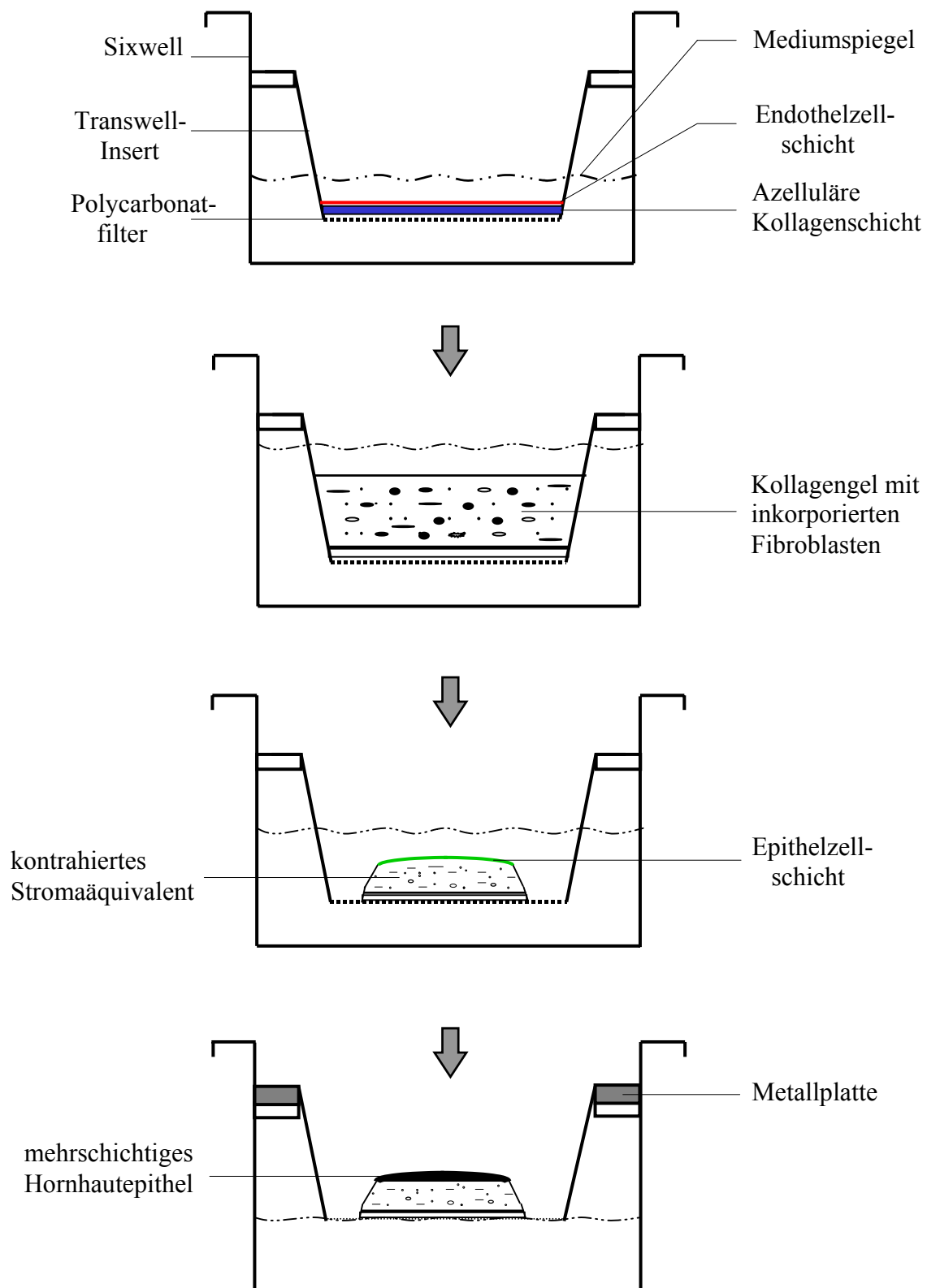


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des schrittweisen Aufbaus des Cornea-Konstruktes

über 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze kultiviert, womit sich eine Gesamtkultivierungszeit von ca. 5 Wochen für das Cornea-Konstrukt ergab. Das jeweilige Nährmedium wurde während der gesamten Kultivierung des Konstruktes, wie bei der Standardkultivierung, dreimal pro Woche gewechselt.

3.2.2.3. Humanes Cornea-Konstrukt

Das humane Cornea-Konstrukt wurde sehr ähnlich, wie in 3.2.2.2. beschrieben, kultiviert. Auf das Bodengel aus Kollagen wurden hier $2 \cdot 10^5$ humane Endothelzellen aufgebracht und für 1 Woche bis zur Konfluenz mit Medium F99 kultiviert. Im nächsten Schritt wurde wiederum eine Stroma-Biomatrix aufgebracht, wobei das Kollagengel genauso wie beim porcinen Konstrukt hergestellt wurde, mit dem Unterschied, dass im humanen Konstrukt $6 \cdot 10^4$ humane Fibroblasten eingebracht wurden. Dieses Gewebeäquivalent wurde mit Ready-Mix für weitere 4 Tage kultiviert, während auch hier eine Kontraktion des Kollagengels zu beobachten war. Im Weiteren wurden $1,5 \cdot 10^5$ CEPI-Zellen aufgesät und mit DMEM/F12 für 1 Woche submers kultiviert. Für weitere 10 Tage wurde das Konstrukt an die Luft-Medium-Grenze angehoben und mit DMEM/F12 kultiviert, wobei auch hier der Gehalt an fetalem Kälberserum auf 2% reduziert wurde. In dieser Zeit kam es dann zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels im humanen Konstrukt. Die Gesamtkultivierungsdauer betrug demnach ca. 4 Wochen, wobei auch hier das jeweilige Nährmedium dreimal wöchentlich ausgetauscht wurde.

3.2.3. Histologische Untersuchungen

Um strukturelle Besonderheiten und spezielle Eigenschaften von Geweben zu untersuchen, bedient man sich ganz gezielt verschiedenster histologischer Untersuchungsmethoden. Im Folgenden werden die genutzten Methoden vorgestellt, die dazu dienten, Cornea-Konstrukt und exzidierte Cornea bezüglich typischer histologischer Merkmale zu vergleichen.

3.2.3.1. Histologische Schnittpräparate

Das Gewebe, sowohl exzidierte porcine Corneae als auch die Cornea-Konstrukte, wurde in einer 75 mM Phosphatpuffer-Lösung pH 7, die 3,5% Formaldehyd (Merck) enthielt, über Nacht bei 4 °C fixiert. Die nachfolgenden Arbeiten einschließlich der histochemischen

Färbung wurden freundlicherweise im Pathologischen Labor Dr. E. Parussis (D-Braunschweig) durchgeführt.

Die Gewebestücke wurden mit Isopropylalkohol dehydratisiert, anschließend in Einbettkassetten in geschmolzenem Hartparaffin eingeschlossen und für den Schnitt entsprechend ausgerichtet. Nach Auffüllen mit flüssigem Paraffin ergab sich ein Block, aus dem mithilfe eines Mikrotoms 4 µm dünne Querschnitte angefertigt werden konnten. Diese wurden für weitere Untersuchungen auf entsprechende Objektträger aufgebracht.

3.2.3.1.1. Histochemische Färbung

Zur Betrachtung des Gewebes im Lichtmikroskop wurde mit Xylol entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin (H&E Färbung) gefärbt, wobei Hämatoxylin die Zellkerne blau und Eosin das Cytoplasma rot einfärbt. Die Gewebeschnitte konnten mit einem Photomikroskop Typ III (Zeiss, D-Oberkochen) sowie mit dem Umkehrmikroskop Olympus IX50 (Abschnitt 3.2.1.4.) ausgewertet werden.

3.2.3.2. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Zum Vergleich von Strukturmerkmalen der cornealen Epithel- und Endotheloberflächen wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden sowohl exzidierte porcine Corneae als auch Cornea-Konstrukte mit 1,5% Paraformaldehyd (Aldrich), 3% Glutaraldehyd (Fluka Chemie, CH-Buchs) und 1,5% Acrolein (Acros Organics, B-Geel) in 0,2 M Kakodylatpuffer pH 7,2 (Sigma) bei 20 °C für 24 h fixiert und danach mit Wasser gespült. Im Anschluss wurden die Gewebestücke mit einer wässrigen Lösung pH 6,2, die 2% Glycin (Roth, D-Karlsruhe), 2% Natriumglutamat (Fluka) und 2% Saccharose (Merck) enthielt, bei 20 °C für 12 h behandelt und mit Wasser gespült. Für weitere 12 h bei 20 °C wurde mit einer wässrigen Lösung pH 4 von 2% Tanninsäure (Merck) imprägniert und wiederum mit Wasser gespült. Sodann wurden die Gewebestücke mit einer wässrigen Lösung, die 2% Osmium(VIII)-oxid (Riedel-de Häen, D-Seelze) enthielt, bei 20 °C für 12 h nachfixiert. Danach wurde über eine aufsteigende Isopropanolreihe (70-100%) entwässert, und das Gewebe nach Ausrichtung in einer SCD 030-Sputteranlage (Balzers, D-Wiesbaden) unter Argonatmosphäre mit Gold bedampft.

Die Proben konnten am Institut für Schweißtechnik der TU Braunschweig mit einem Stereoscan 250 (Cambridge Instruments, GB-Cambridge) untersucht werden.

3.2.3.3. Immunhistologie

3.2.3.3.1. Vorbereiten der Kulturen

Um das Herauslösen von Substanzen oder Denaturierung von Proteinen zu verhindern, wurden die immunhistochemischen Untersuchungen an Gefrierschnitten durchgeführt. Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte wiederum im Pathologischen Labor Dr. E. Parussis (D-Braunschweig).

Dazu wurden Gewebestücke exzidierter porciner Corneae und von Cornea-Konstrukten mit Cryo-Embedding-Compound (Microm Laborgeräte GmbH, D-Walldorf) auf Metallstempel aufgebracht, entsprechend ausgerichtet und durch Kälteeinwirkung fixiert. Mit einem Gefriermikrotom wurden 14 µm dünne Querschnitte der Gewebe angefertigt, direkt auf Objektträger übertragen und bei -18 °C gelagert.

3.2.3.3.2. Immunhistologischer Laminin-Nachweis

Die Gefrierschnitte wurden mit -20 °C kaltem Aceton für 10 Minuten fixiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4 °C mit einer wässrigen Dispersion, die 5% Magermilchpulver (Heirler Cenovis, D-Radolfzell) und 1% Triton X-100 enthielt, behandelt. Es wurde mit PBS gewaschen und zur Inaktivierung gewebeeigener Peroxidasen mit einer Lösung, die aus 4 Teilen Methanol und 1 Teil 3% H₂O₂ bestand, für 10 Minuten behandelt. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen, die Schnitte mit einem Anti-Laminin (Rb) Antikörper (Sigma) als primärem Antikörper, der 1:20 in einer 5% Magermilchpulverdispersion + 1% Triton X-100 verdünnt worden war, überschichtet und für 3 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Es wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen und dann mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Rabbit IgG (Gt) Antikörper (Sigma) als sekundärem Antikörper, der 1:20 verdünnt in 5% Magermilchpulverdispersion vorlag, für 1,5 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit Sigma Fast[®] DAB + Metallenhancer (Sigma), das zusätzlich Cobaltchlorid enthielt, behandelt (Abschnitt 3.2.1.5.). Ein positiver Nachweis führte hierbei zu einem unlöslichen dunkelblauen bis schwarzen Farbpräzipitat als Endprodukt einer positiven DAB-Reaktion. Die Schnitte konnten anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

3.2.3.3.3. Immunhistologischer Fibronektin-Nachweis

Die Gefrierschnitte wurden wie oben beschrieben fixiert und über Nacht zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen behandelt. Nach Waschen mit PBS wurde als primärer Antikörper ein Anti-Human Fibronektin (Rb) Antikörper (Dako, D-Hamburg), der mit Fibronektin vom Schwein kreuzreagiert, aufpipettiert und für 3 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Der Antikörper wurde in einer 1:100 Verdünnung mit 0,1 M Natriumchloridlösung, die 5% Magermilchpulver und 1% Triton X-100 enthielt, eingesetzt. Anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen und als sekundärer Antikörper ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter Anti-Rabbit Ig (Sw) Antikörper (Dako), 1:20 verdünnt in 0,1 M Natriumchloridlösung + 5% Magermilchpulver, eingesetzt. Abschließend wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen und die Schnitte zur Verzögerung des Ausbleicheffektes mit Mounting-Medium Citifluor-glycerol (Citifluor, GB-London) eingedeckt. Die so behandelten Gewebeschnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus (Zeiss, D-Jena) inkl. digitaler Bildaufnahme mit der Filterkombination (Anregung: BP 450-490 nm, Sperrfilter: FT 510 nm, Emission: LP 515 nm) ausgewertet. Ein positiver Nachweis zeigte sich durch hellgrüne Lichtemission.

3.2.4. Elektrophoretische Bestimmung des Keratinmusters der Kulturen

Zur Bestimmung des epithelialen Keratinmusters der porcinen Cornea-Konstrukte und der exzidierten porcinen Hornhaut wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Bei der SDS-PAGE kommt es durch den Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) zu einer gleichmäßigen negativen Ladung der aufzutrennenden Proteine. Bei Anlegen eines Stromes führt dies zu einer Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, wobei das Polyacrylamidgel als Molekularsieb fungiert. Des Weiteren ist die erfolgreiche Auftrennung von Proteingemischen eine wichtige Voraussetzung zur Durchführung von Western-Blot Untersuchungen.

3.2.4.1. Vorbereiten der Kulturen

Zur Extraktion der Keratine wurde eine von Woodcock-Mitchel et al. (1982) beschriebene Methode genutzt. Das Epithelgewebe von porcinen Cornea-Konstrukten und exzidierten porcinen Hornhäuten wurde vorsichtig mit einem Skalpell abgekratzt. Zur Entfernung der

wasserlöslichen Proteine wurde das Epithelgewebe unter Rühren für 4 h bei Raumtemperatur mit 25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl) Lösung pH 7,4, die mit 0,6 M Kaliumchlorid (Merck), 1% Triton X-100 sowie mit einem Gemisch aus 4 Protease-Inhibitoren supplementiert war, aufgeschlossen. Die Protease-Inhibitoren waren zu 1 mM Ethylendiaminetetraessigsäure EDTA (ICN), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid PMSF (Sigma), 1 mg/ml N α -p-Tosyl-L-argininmethylester TAME (Sigma) und 5 μ g/ml Pepstatin A (Sigma) in der Lösung enthalten. Es wurde für 10 min bei 5000 min⁻¹ mit der Sigma Laborzentrifuge 3-15 (Sigma, D-Osterode) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das keratinhaltige Pellet wurde in 1 ml einer 25 mM Tris-HCl Lösung pH 7,4, die 9 M Harnstoff (Riedel-de Haën) enthielt, aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur unter Rühren gelöst. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wurde wieder für 10 min und 5000 min⁻¹ zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Durch Zusatz von 200 μ l 70% Trichloressigsäure (Merck) wurde bei 4 °C über Nacht das Protein gefällt und dann für 20 min bei 5000 min⁻¹ abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 25 mM Tris-HCl pH 7,4 aufgenommen und 1:1 mit 2 \times SDS Sample Buffer (ICN) versetzt. Dieser zweifach konzentrierte Probenpuffer enthielt 0,125 M Tris, 2% SDS, 10% Saccharose, 0,02% Bromphenol Blau sowie 5% 2-Mercaptoethanol und war auf pH 8 eingestellt. Abschließend wurde die aufgearbeitete Probe für 8 min bei 95 °C inkubiert.

3.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung erfolgte mit dem Mini Vertical Gel System EC 120 (EC Apparatus Corporation, USA-Holbrook) und Consort E 834 (Consort NV, B-Turnhout) als Spannungsquelle. Die Polyacrylamidgele hatten eine Größe von 8,3 \times 7,4 cm und eine Stärke von 0,75 mm.

	Sammelgel	Trenngel
Wasser	3,4 ml	1,6 ml
30% Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1) Mix (Sigma)	0,83 ml	2,0 ml
1,875 M Tris (pH 8,8)	-	1,3 ml
0,6 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml	-
10% SDS (ICN)	0,05 ml	0,05 ml
10% Ammoniumpersulfat (Sigma)	0,05 ml	0,05 ml
TEMED (Sigma)	0,005 ml	0,002 ml

Als Trenngel wurde ein 12%iges Polyacrylamidgel verwendet, während das Trenngel 5% Polyacrylamid beinhaltet. Nach Gießen von Trenn- und Sammelgel wurden die Proben mit maximal 10 µl je Probentasche aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde der High Molecular Weight Range Sigmamarker[®] (Sigma) verwendet, der 8 Proteine mit einem Molekulargewicht von 36 bis 205 kDa enthält. Als Laufpuffer konnte der 1:10 mit Wasser verdünnte 10× Tris-Glycine-SDS Running Buffer (ICN) eingesetzt werden, woraus sich folgende Zusammensetzung ergab:

Laufpuffer

Tris (Base) 0,025 M
 Glycin 0,192 M
 SDS 0,1 %
 pH 8,8

Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V, 80 mA und 25 W in ca. 80 min. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte direkt in den Gelen durch Coomassie-Blau-Färbung. Dazu wurden die Gele etwa 1 h mit der Färbelösung behandelt. Anschließend wurde für ca. 30 min mit Entfärber I und für weitere 60 min mit Entfärber II entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Gele konnten problemlos für mehrere Wochen in Entfärber II gelagert werden.

	Färbelösung	Entfärber I	Entfärber II
Coomassie blue			
R-250 (Sigma)	200 mg		
Methanol	80 ml	80 ml	10 ml
Eisessig	20 ml	20 ml	14 ml
Wasser	ad 200 ml	ad 200 ml	ad 200 ml

3.2.5. Western-Blot

3.2.5.1. Blotten von Elektrophoresegelen

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE ist es möglich, die Proteinbanden mittels elektrophoretischen Transfers aus einem Gel auf eine Membran zu übertragen. Diese Methode ermöglicht es, die Proteine auf der Membran zu immobilisieren und so einer Immundetektion zugänglich zu machen.

Das Blotting erfolgte mit einem EC 140 Mini Blot Modul (EC Apparatus Corporation, USA-Holbrook) und dem Consort E 834 (Consort NV, B-Turnhout) als Spannungsquelle. Als Membran wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore, D-Eschborn) verwendet. Die Blotmembran wurde kurz mit Methanol benetzt und danach ebenso wie das auf Gelgröße zugeschnittene Whatman-Papier (3MM, Schleicher&Schuell, D-Dassel), die Scotch Brite® Schwämme und Anode bzw. Kathode einige Minuten mit Blotpuffer äquilibriert. Es wurden die einzelnen Lagen wie folgt luftblasenfrei geschichtet:

Anode (Palladiumdraht)

Scotch Brite® Schwamm (2 Lagen)

Whatman-Papier

Transfermembran

Gel

Whatman-Papier

Scotch Brite® Schwamm

Kathode (Gitterelektrode)

Blotpuffer

Tris-Base 5,8 g

Glycin 2,9 g

SDS 0,37 g

Methanol 200 ml

Wasser ad 1000 ml

Der Transfer wurde bei 15 V, 120 mA und 25 W für 1,5 h durchgeführt. Zur Visualisierung des erfolgreichen Protein-Transfers konnten die Banden reversibel mit Ponceau-Orange angefärbt werden. Dazu wurde die Membran kurz in der Färbelösung geschwenkt und mit Wasser abgespült. Die Proteine waren auf der Membran als orangerote Banden zu erkennen. Um eine spätere Zuordnung der Banden nach ihrem Molekulargewicht weiter gewährleisten zu können, wurden die Banden des Markers mit Kugelschreiber markiert, da sie später nicht mehr auftreten. Mit Wasser wurde bis zur Entfärbung weiter gespült, wobei Reste der Färbung bei dem anschließenden Immunblotting nicht störten.

Ponceau-Orange-Färbelösung

Ponceau S (Serva, D-Heidelberg) 0,5 g

Methanol 40 ml

Eisessig 15 ml

Wasser ad 100 ml

3.2.5.2. Immunblotting

Zur Identifizierung von Keratin K3, ein 64 kDa Protein, welches als Marker für ausdifferenziertes corneales Epithelgewebe gilt [Schermer et al., 1986], wurde ein Immunblotting durchgeführt. SDS-PAGE und Proteintransfer wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Um unspezifische Bindungstellen abzusättigen, wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit Tris-buffered saline (TBS) Lösung, die 10% NBCS und 0,1% Tween 20 (ICI Surfactants, GB-Middlesbrough) enthielt, inkubiert.

Tris-buffered saline (TBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Tris-Base	3,0 g
Wasser	ad 1000 ml pH 8,0

TBS-T

TBS mit 0,1% Tween 20

Als primärer Antikörper wurde ein monoklonaler Anti-Epithelial Keratin K3, clone AE5, (Ms) Antikörper (ICN) verwendet. Die Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Antikörper in einer 1:100 Verdünnung mit TBS-T + 10% NBCS inkubiert. Als sekundärer Antikörper konnte wiederum ein Peroxidase-konjugierter Anti-Maus (Gt-IgG) Antikörper (Sigma), 1:200 in TBS-T + 10% NBCS verdünnt, eingesetzt werden, wobei auch hier für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Membran gründlich je 2 × 5 min mit TBS-T, TBS-T mit 0,5 M NaCl sowie mit TBS-T mit 0,5% Triton X-100 gewaschen und wieder in TBS-T überführt [Ober, 1997].

Die Detektion erfolgte wiederum mittels Diaminobenzidin-Färbung (Abschnitt 3.2.1.5.). Dazu wurde die Membran für 2 min mit Sigma Fast[®] DAB inkubiert und anschließend gründlich mit Wasser gespült. Ein positiver Befund war durch eine deutliche Braunfärbung der Proteinbande zu erkennen.

3.2.6. Permeationsuntersuchungen

Zur Bestimmung der Permeabilität der Cornea-Konstrukte und der exzidierten Cornea wurden vergleichende Permeationsuntersuchungen durchgeführt. Untersucht wurde, welche Menge an Arzneistoff in Abhängigkeit von der Zeit durch die Konstrukte bzw. die Exzidate permeiert. Die Permeationsexperimente wurden mit einer modifizierten Franz-Zelle (Abbildung 3.3) durchgeführt [Franz, 1975], wobei als Donator, die unter 3.1.4. beschriebenen Ophthalmika,

eingesetzt wurden. Um absolute Dichtigkeit zu gewährleisten, wurde der Aufsatz der Franz-Zelle bei wässrigen Donorsystemen zusätzlich mit einer Silikonzubereitung (Baysilone, Bayer, D-Leverkusen) behandelt. Als Akzeptormedium diente wiederum PBS (ICN), das durch ein Wasserbad bei 37 °C temperiert wurde. Die Permeationsfläche betrug 4,91 mm² und das Akzeptorvolumen lag je nach Messzelle zwischen 6,6 und 7,3 ml. Während der Dauer des gesamten Permeationsexperimentes wurde mittels eines Magnetrührers (400 min⁻¹) für eine gleichmäßige Akzeptordurchmischung gesorgt. Die Probenentnahme von 250 µl erfolgte alle 60 min über einen Zeitraum von 7 bzw. 8 h, wobei entnommene Probenvolumina durch temperierten Puffer ersetzt wurden. Um Verdunstungen während der Versuchsdauer zu minimieren, wurden Öffnungen der Franz-Zellen mit Tesafilm abgedichtet. Die Arzneistoffkonzentrationen im Akzeptorkompartiment wurden mit einer HPLC-Analytik (Abschnitt 3.2.7.) bestimmt.

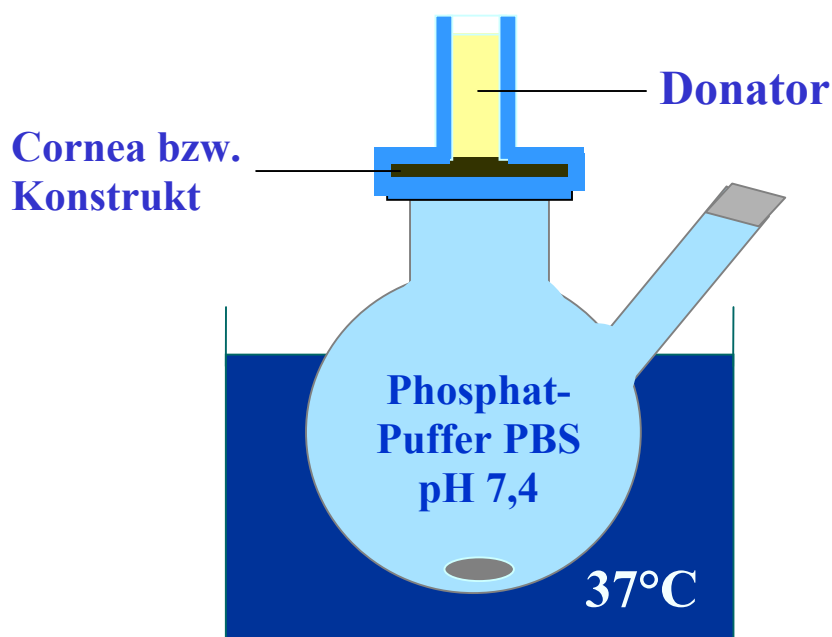


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der verwendeten modifizierten Franz-Zelle

3.2.7. HPLC-Bestimmung der Arzneistoffe

Die permeierte Menge an Arzneistoff wurde mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) quantitativ bestimmt. Die Untersuchungen wurden mit einem HPLC-System der Fa. Waters (D-Eschborn) durchgeführt, das aus einem Pumpensystem 515, einem Autosampler 717 plus (Probenauftrag 20 µl) und einem UV-Detektor 486 zusammengesetzt war. Die

Auswertung erfolgte mit einer Waters Millennium 32 Chromatography Manager Software (Waters).

Pilocarpinhydrochlorid: Reversed Phase RP Säule Gromsil® 120 ODS-3 CP 5µm 125×4 mm (Grom, D-Herrenberg), mobile Phase: 23 Teile Acetonitril (Acros Organics) und 77 Teile Puffer pH 7,0 (6,81 g/l KH₂PO₄, 1,66 g/l KOH) (Merck), Flussrate: 1,0 ml/min [Papantoniou, 1995], Retentionszeit: 2,7 min, Detektion: Wellenlänge $\lambda=215$ nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 0,25-50 µg/ml (Korrelationskoeffizient >0,999)

Hydrocortison: RP Säule Hypersil® ODS 5 µm 250×4 mm (Grom), mobile Phase: 60 Teile Methanol (Acros Organics) und 40 Teile Wasser, Flussrate: 1,1 ml/min [Way und Hadgraft, 1991], Retentionszeit: 4,3 min, Detektion: $\lambda=250$ nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 0,5-10 µg/ml (Korrelationskoeffizient >0,9999)

Befunololhydrochlorid: RP Säule Gromsil® 120 ODS-3 CP 5µm 125×4 mm (Grom), mobile Phase: 45 Teile Methanol und 55 Teile einer wässrigen Lösung von 50 mM NaH₂PO₄ (Merck), Flussrate: 1,0 ml/min [Sasaki et al., 1995], Retentionszeit: 2,2 min, Detektion: $\lambda=292$ nm, Mehrpunkt-Kalibrierung im Bereich 0,25-50 µg/ml (Korrelationskoeffizient >0,9999)

3.2.8. Dichtebestimmung

Die Dichtebestimmung flüssiger Systeme erfolgte bei 20 °C mit einem digital rechnenden Dichtemesser DMA 46 (Anton Paar, A-Graz). Die Kalibrierung des Gerätes wurde durch Messung von Wasser und Luft bei 20 °C durchgeführt. Bei halbfesten Systemen wurde die Dichte mithilfe eines Luftvergleichs-Pyknometers (Beckmann, D-München) ermittelt.

3.2.9. Bestimmung des Verteilungskoeffizienten n-Octanol/wässrige Lösungen ($P_{\text{oct/wasser}}$)

Für Pilocarpinhydrochlorid, Hydrocortison und Befunololhydrochlorid wurde der Verteilungskoeffizient n-Octanol/wässrige Lösung $P_{\text{oct/wasser}}$ bestimmt, wobei als wässrige Lösung, den Formulierungen entsprechend, für PHCl und HC eine isotone 0,9%ige NaCl-Lösung pH 5,0 und für BHCl eine isotone 0,9%ige NaCl-Lösung pH 7,2 eingesetzt wurde. Hierzu wurden 5,00 ml der Arzneistofflösung (PHCl 20 mg/ml, HC 0,2 mg/ml, BHCl 5

mg/ml) und 5,00 ml des vorher über 24 h mit der entsprechenden arzneistofffreien wässrigen Lösung gesättigten n-Octanols gemischt und 48 h bei 20 °C gerührt. Der Gehalt an Arzneistoff in der wässrigen Phase (c_{wasser}) wurde nach vollständiger Phasentrennung mithilfe der HPLC (Abschnitt 3.2.7.) bestimmt. Der Arzneistoffgehalt der n-Octanol Phase (c_{oct}) ergab sich nach Differenzbildung. Der Verteilungskoeffizient $P_{\text{oct/wasser}}$ konnte durch Division von c_{oct} und c_{wasser} bestimmt werden.

3.2.10. pH-Wert-Bestimmung

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit einem Microprocessor pH-Meter pH 539 (Wissenschaftliche Technische Werkstätten, D-Weilheim) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte mit Standardpufferlösung pH 4,66 und 9,00 (Merck).

3.2.11. Prüfung auf signifikante Unterschiede von Mittelwerten (*t*-Test)

Bei Homogenität der Streuung (kein signifikanter Unterschied der Varianzen gemäß *F*-Test) erfolgte die Überprüfung auf signifikante Unterschiede bei den Ergebnissen der Permeationsuntersuchungen mittels zweiseitigem *t*-Test. Die Annahme bzw. Ablehnung der Nullhypothese H_0 erfolgte bei $\alpha=5\%$ (α =Irrtumswahrscheinlichkeit) [Bauer et al., 2002].

4 Versuchsergebnisse und Diskussion

4.1. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der cornealen Zellen

4.1.1. Primärkultivierung der porcinen cornealen Zellen

4.1.1.1. Porcine Cornea-Endothelzellen

Als geeignetste Methode zur Anlage reiner Primärkulturen von porcinen Endothelzellen erwies sich die in Abbildung 3.1 dargestellte enzymatische Behandlung des Gewebes sowie anschließendes mechanisches Abkratzen mithilfe eines Silikonspatels. Im Gegensatz zu durchgeführten Explantatversuchen, wie bei Perlman und Baum (1974) sowie Nayak und Binder (1984) beschrieben, führte die enzymatische Methode schnell zu stabilen Kulturen. Um einen hohen Verlust an vitalen Zellen zu vermeiden, ist es nötig, die Isolierungsbedingungen möglichst genau einzuhalten, da ein zu langes Einwirken von Trypsin/EDTA-Lösung zu einem nicht vertretbaren Maß an Zellschädigung führt. Durch das vorsichtige Abnehmen der gelösten Endothelzellen konnte eine Kontamination mit stromalen Zellen und somit eine Mischkultivierung vermieden werden. Die Methodik lieferte rasch und zuverlässig Primärkulturen von Endothelzellen. Schon nach wenigen Stunden war das Anheften, und nach kurzer Adaptionsphase die Proliferation der Zellen lichtmikroskopisch zu beobachten. Die Primärkulturen zeigten während der ersten Populationsverdopplungen noch ein mosaikartiges Muster hexagonaler Zellen, welche nach Subkultivierung in polygonale Formen übergingen. Die erste Passagierung der Zellen konnte nach 7 Tagen durchgeführt werden. Abbildung 4.1 zeigt den Monolayer einer konfluent gewachsenen Kultur an porcinen Cornea-Endothelzellen.

4.1.1.2. Porcine Cornea-Stromazellen

Die Isolierung der Fibroblasten war im Vergleich zu den anderen Zelltypen einfacher durchzuführen (Abbildung 3.1) und gelang aufgrund der hohen Wachstumsrate in Kultur problemlos. Einzig das Aufflottieren von Gewebestücken bei der Explantattechnik führte anfangs zum Versagen der Primärkultivierung. Dieses Hindernis wurde behoben, indem sich die Stücke vor dem Übersichten mit Medium für 30 Minuten im Inkubator auf dem Substrat anheften konnten. Schon nach 6-7 Tagen konnte ein schnelles Auswachsen der Fibroblasten

beobachtet werden. Die erste Subkultivierung der Zellen erfolgte in der Regel nach etwa zehn Tagen. Durch das vollständige Abtrennen von Endothel- und Epithelgewebe war es auch hier möglich, reine Kulturen an stromalen Zellen zu erhalten. Die Fibroblasten ließen sich morphologisch sehr einfach von Endothel- und Epithelzellen durch ihr langgestrecktes, spindelförmiges Aussehen bei Kultivierung im Monolayer unterscheiden. Abbildung 4.2 zeigt die Primärkultur von porcinen cornealen Stromazellen nach Auswachsen aus dem Gewebeexplantat.

4.1.1.3. Porcine Cornea-Epithelzellen

Eindeutig schwieriger als die Isolierung von Endothel- und Stromazellen gestaltete sich die Inkulturnahme der porcinen Epithelzellen. Aufgrund der vielfach beschriebenen erfolgreichen Kultivierung von Epithelzellen (z.B. Kaninchen, Rind, Mensch und andere Spezies, Abschnitt 2.5.1.2.) mithilfe der Explantattechnik wurde auch hier versucht, stabile Kulturen an Epithelzellen durch Auswachsen aus dem Gewebeexplantat zu gewinnen. Bei diesen Versuchen ergab sich, dass die epithelialen Zellen zwar gut aus dem Gewebe auswuchsen, allerdings die Proliferation nach 4-5 Tagen stark abnahm und nach 7-8 Tagen zum Erliegen kam, so dass keine stabilen Kulturen durch Subkultivierung erhalten werden konnten. Ähnliche Befunde für porcine Epithelzellen beschrieb Schneider (1997). Darauf aufbauend wurde für weitere Versuche zur Isolierung reiner Epithelzellkulturen eine von Gipson und Grill (1982) erstmalig beschriebene Methode verwendet, die Dispase II als proteolytisches Enzym nutzt, das selektiv Epithelgewebe von der Basalmembran löst. Versuche mit Thermolysin als Enzym zur Isolierung epithelialer Zellen [Germain et al., 1993; Parnigotto et al., 1998] führten nicht zum Erfolg. Mithilfe der in Abschnitt 3.2.1.1.4. beschriebenen Methode war es dann möglich, stabile und reine Kulturen an porcinen cornealen Epithelzellen zu erhalten, die auch subkultiviert werden konnten. Auch hier war auf die Einhaltung der Versuchsbedingungen unbedingt zu achten, um die Vitalität der Zellen zu erhalten sowie eine Mischkultivierung mit stromalen Zellen durch zu heftiges Abkratzen des Epithels zu vermeiden. Die Zellen konnten nach etwa 7 Tagen erstmalig passagiert werden. Sie zeigen in Kultur eine polygonale Zellform und zeichnen sich bei Primärkultivierung durch Ausbildung eines dicht gewachsenen Monolayers aus (Abbildung 4.3).

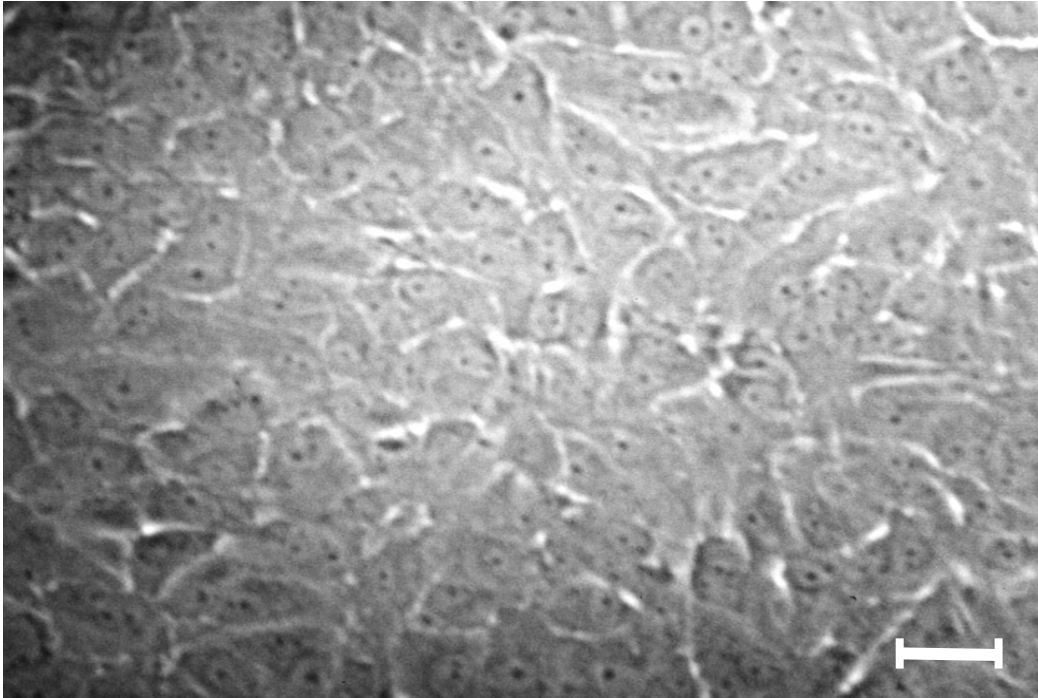


Abbildung 4.1: Porcine corneale Endothelzellen als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 25 μm

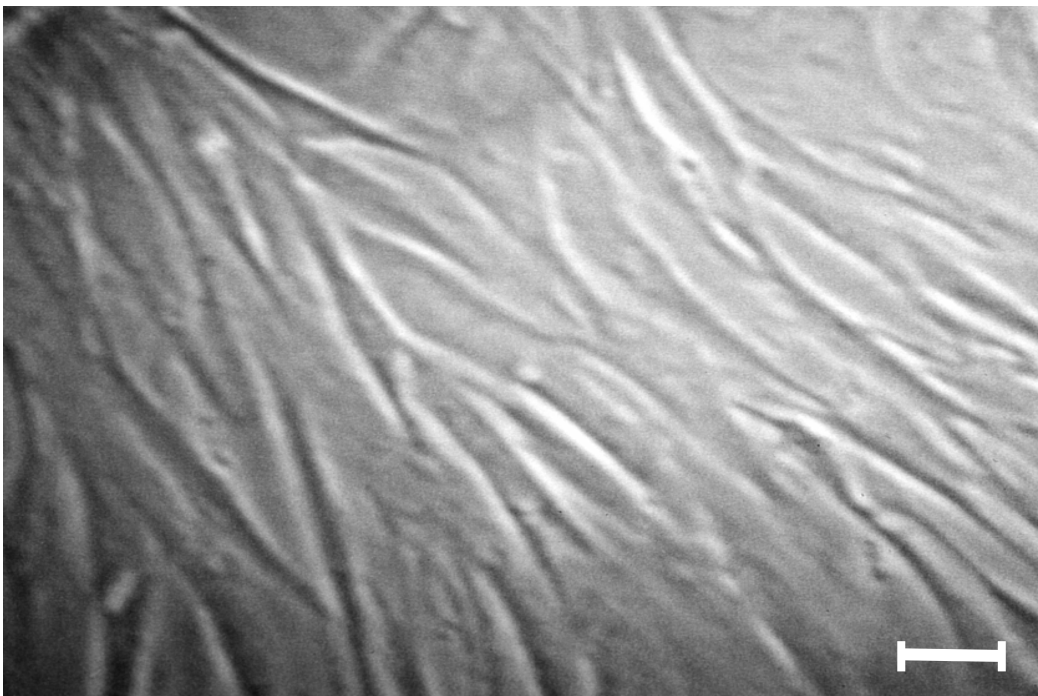


Abbildung 4.2: Porcine corneale Stromazellen, Primärkultur nach Auswachsen aus dem Explantat, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 25 μm

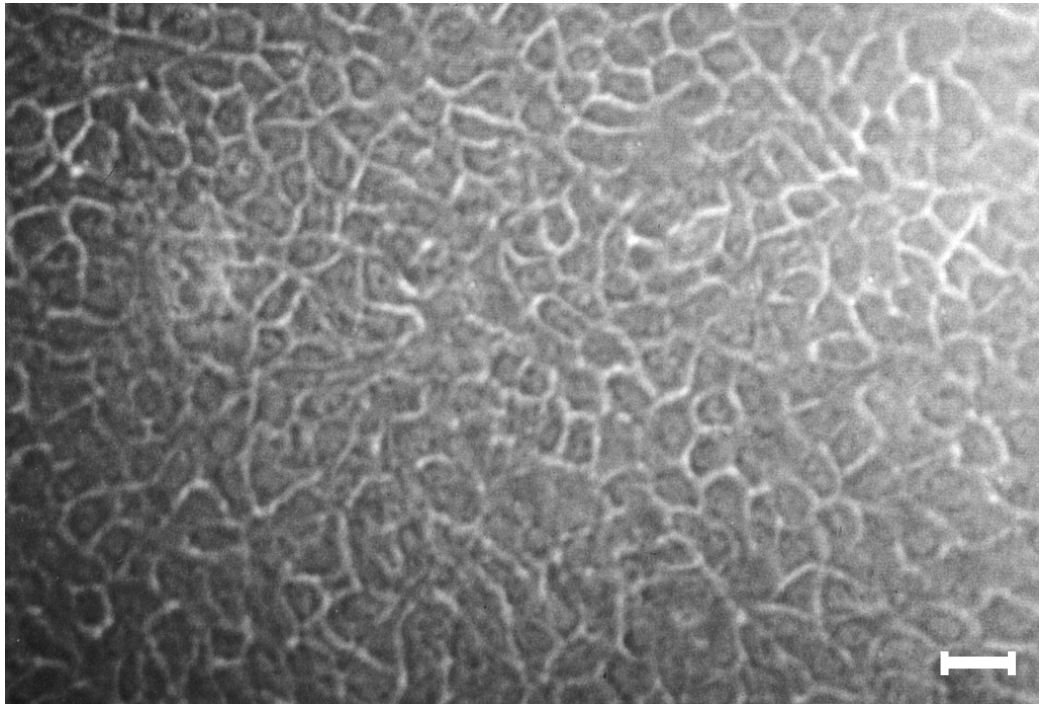


Abbildung 4.3: Porcine corneale Epithelzellen als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 25 μm

4.1.2. Subkultivierung

Zur Kultivierung einer in vitro Cornea war es natürlich nötig, über die Primärkultivierung hinaus durch Subkultivierung der Zellen ausreichendes Zellmaterial für die Untersuchungen zu erhalten. Um die Zellen auf die spätere Kokultivierung in einem Konstrukt vorzubereiten, wurde versucht, für alle drei Zelltypen das gleiche Wachstumsmedium zu verwenden. Wie schon in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, ist es möglich, die verschiedenen Zelltypen anderer Spezies in DMEM mit einem 10%igen Zusatz an Neugeborenen Kälberserum zu kultivieren [Zieske et al., 1994; Tegtmeier et al., 2001]. Dieses Medium wurde auch für die Subkultivierung der isolierten porcinen Zellen genutzt. Die Eignung des beschriebenen Mediums als Wachstumsmedium konnte durch Untersuchungen des Wachstumsverhaltens der Zellen in diesem Medium gezeigt werden (Abschnitt 4.1.5.). Für die Subkultivierung konnte auf die weitere Beschichtung der Kulturböden mit Kollagen verzichtet werden, da alle Kulturen auf dem gewöhnlichen Substrat (Polystyrol) der Kulturflaschen gutes Anheftungs- und Wachstumsvermögen zeigten.

Der Einsatz von Trypsin/EDTA-Lösung ist bis heute die gebräuchlichste Enzymlösung zum Ablösen des Zellrasens vom Kulturboden. Auch für die cornealen Kulturen wurde diese

Lösung zur Subkultivierung der Zellen eingesetzt, wobei die optimale Einwirkzeit bei 5-8 min lag. Eine 1:4 bis 1:6 Verdünnung der abgelösten Zellen bei der Aussaat in neue Kulturgefäße erwies sich als günstigstes Subkultivierungs-Verhältnis. Alle drei Zelltypen konnten mindestens über 6 Passagen kultiviert werden, ohne dass eine starke Änderung im Wachstumsverhalten oder ihrer Morphologie zu beobachten war.

4.1.3. Kryokonservierung und Aussaat-effizienz

Um für die Untersuchungen zum Aufbau der Cornea-Konstrukte nicht fortlaufend mit neu isolierten Zellen arbeiten zu müssen, sondern Zellmaterial mit gleichen Eigenschaften zu nutzen, wurde durch vermehrte Subkultivierung eine erhöhte Zahl an Zellen erhalten, die durch Kryokonservierung über lange Zeit gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut werden können. Die Lagerung der Zellen erfolgt bekanntermaßen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Zur Vermeidung von Zellschäden während des Einfrierens und Auftauens wurden die Zellen in Gefriermedium suspendiert und eingefroren, das aus Wachstumsmedium und 10% Kryoprotektivum, hier DMSO [Lovelock und Bishop, 1959], bestand. Die Vitalität der Zellen nach Einfrieren und Auftauen hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab (z.B. Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit, Auswahl und Konzentration des Kryoprotektivums, Zustand der Zellen zum Zeitpunkt des Einfrierens etc.). Um die Eignung der gewählten Methode zur Kryokonservierung der cornealen Zellen (Abschnitt 3.2.1.3) zu untersuchen, wurde die Aussaat-effizienz der Zellen, die ein Maß für das Anheftungsvermögen und die Überlebensfähigkeit der Zellen nach Kryokonservierung ist, bestimmt. Die Aussaat-effizienz der einzelnen porcinen cornealen Zelltypen ist in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

	Endothelzellen	Fibroblasten	Epithelzellen
Aussaat-effizienz [%]	80,3 ± 5,9	66,8 ± 5,5	77,6 ± 7,4

Tabelle 4.1: Bestimmung der Aussaat-effizienz der einzelnen porcinen cornealen Kulturen nach Kryokonservierung, Mittelwert und Standardabweichung (n=5)

Die in Tabelle 4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich die porcinen cornealen Zellkulturen mit der gewählten Methode gut kryokonservieren lassen, wobei Endothelzellen und Epithelzellen gegenüber den Fibroblasten die deutlich bessere Aussaat-effizienz besitzen.

4.1.4. Immuncytochemische Charakterisierung

Zur Charakterisierung bzw. Identifikation der verschiedenen cornealen Zelltypen ist es möglich, durch immuncytochemische Untersuchungen, die zelltypenspezifischen Intermediärfilamente nachzuweisen. Intermediärfilamente (IF) sind kräftige und dauerhafte, strukturerhaltende Proteinfasern im Cytoplasma der meisten höheren Eukaryontenzellen, die wie gewundene Seile gebaut sind und einen typischen Durchmesser von 8-10 nm aufweisen. In den meisten tierischen Zellen bilden sie einen „Korb“ um den Kern und erstrecken sich bis zum Zellrand [Alberts, 1995]. IF lassen sich auf der Basis der Aminosäuresequenz in vier große Kategorien einteilen, wobei an dieser Stelle das Vorkommen der typischen IF Keratine und Vimentin untersucht wurde.

Keratine, die sich in erster Linie in Epithelzellen finden lassen [Sun und Vidrich, 1981], unterteilen sich in zwei Unterfamilien, saure Keratine (M_w 40.000-70.000 Da) und neutrale oder basische Keratine (M_w 40.000-70.000 Da), wobei die Keratinfilamente immer als Heteropolymere, die aus einer gleichen Zahl von Untereinheiten aus jeder dieser beiden Keratin-Unterfamilien aufgebaut sind, vorkommen. Mit mindestens 19 verschiedenen Formen in humanen Epithelien bilden die Cytokeratine die komplexeste Klasse an IF, wobei sich viele morphologisch und funktionell verschiedene Epithelzellen anhand der von ihnen exprimierten Keratintypen unterscheiden lassen [Moll et al., 1982].

Vimentin (M_w 53.000 Da) wird von vielen Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert und ist somit in Fibroblasten und Endothelzellen weit verbreitet. Aufgrund dessen wird Vimentin hier als Marker eingesetzt, um Endothelzellen von Epithelzellen zu unterscheiden. Corneale Fibroblasten und Endothelzellen lassen sich sehr gut aufgrund ihrer verschiedenen Morphologie lichtmikroskopisch unterscheiden.

Die Untersuchungen zum Nachweis auf Cytokeratine und Vimentin wurden jeweils mit allen drei Zelltypen, wie in Abschnitt 3.2.1.5. beschrieben, durchgeführt. Die Epithelzellen zeigten kein Vorkommen von Vimentin, jedoch war der Nachweis auf Cytokeratine positiv, deutlich an der braunen Färbung zu erkennen (Abbildung 4.4). Der Nachweis auf Cytokeratine in den kultivierten Fibroblasten und Endothelzellen verlief negativ, wohingegen Vimentin in beiden Zellarten nachgewiesen werden konnte. Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen durch deutliche Braunfärbung das Vorhandensein von Vimentin in den Zellen an. Die Ergebnisse der immuncytochemischen Untersuchungen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

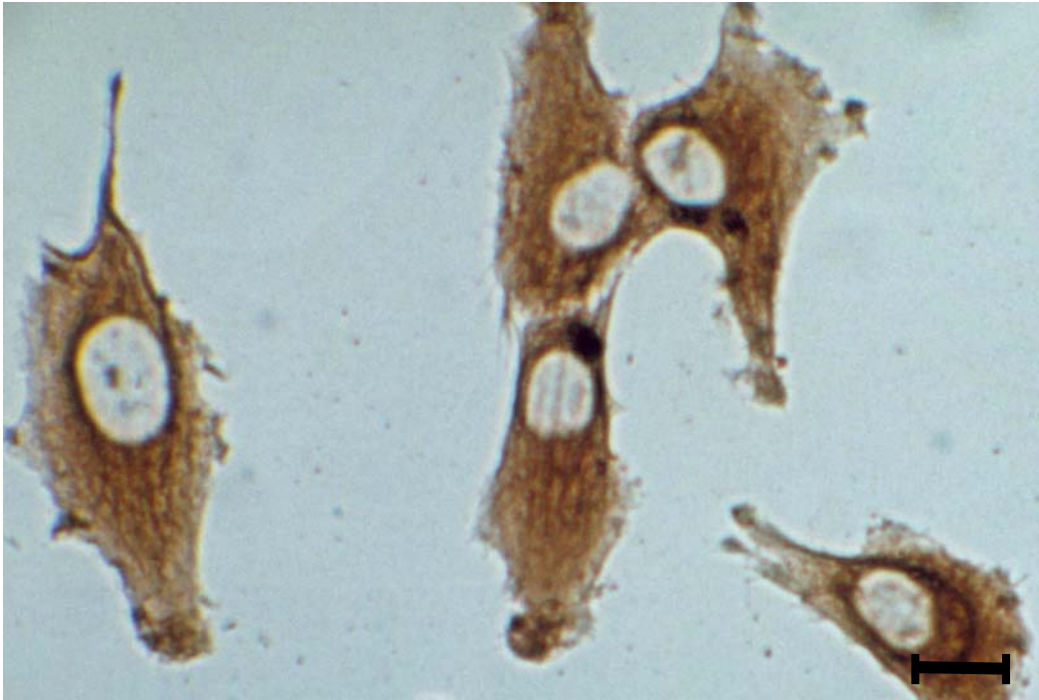


Abbildung 4.4: Immuncytochemischer Nachweis von Cytokeratinen in porcinen cornealen Epithelzellen, lichtmikroskopische Aufnahme; Balkenlänge entspricht 10 μm

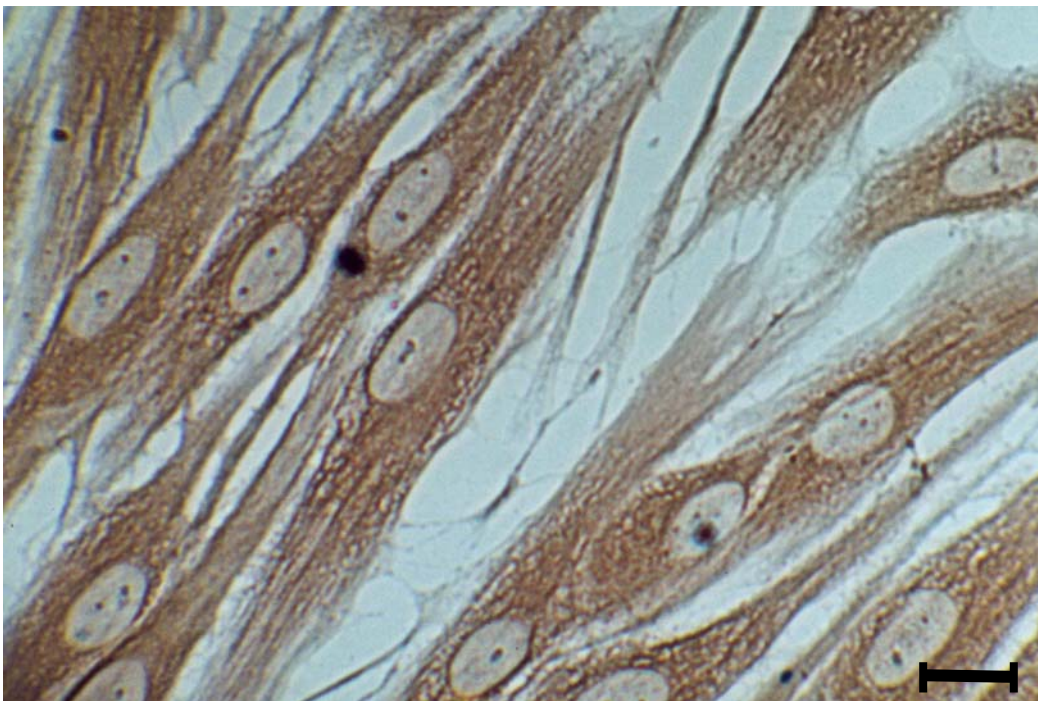


Abbildung 4.5: Immuncytochemischer Nachweis von Vimentin in porcinen cornealen Stromazellen, lichtmikroskopische Aufnahme; Balkenlänge entspricht 10 μm

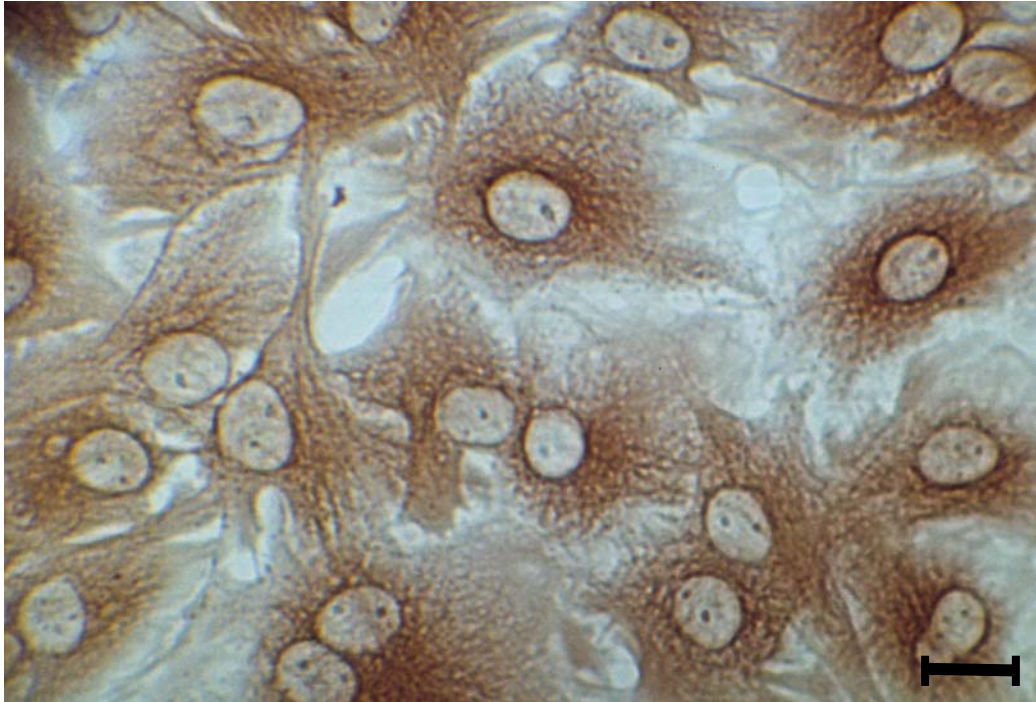


Abbildung 4.6: Immuncytochemischer Nachweis von Vimentin in porcinen cornealen Endothelzellen, lichtmikroskopische Aufnahme; Balkenlänge entspricht 10 µm

	Cytokeratine	Vimentin
Epithelzellen	positiv	negativ
Fibroblasten	negativ	positiv
Endothelzellen	negativ	positiv

Tabelle 4.2: Immuncytochemischer Nachweis der Intermediärfilamente Cytokeratine und Vimentin in den verschiedenen kultivierten Corneazellen

4.1.5. Wachstumsverhalten der cornealen Zellen

Um zu untersuchen, ob das zur Isolierung der Zellen ausgewählte Medium bzw. die Kultivierungsbedingungen auch zur Standardkultivierung und Vermehrung der Corneazellen geeignet sind, wurde das Wachstumsverhalten der Zellen, wie in Abschnitt 3.2.1.6. beschrieben, bestimmt. Aus den erhaltenen sigmoiden Wachstumskurven lassen sich typische Parameter ansehen, mit denen sich der Zustand einer Kultur beschreiben lässt. Ein Wachstumszyklus beginnt mit einer Latenz-Phase (**lag-Phase**). In dieser Zeit nach der Aussaat der Zellen nimmt die Zellzahl nicht oder kaum zu. Sie stellt eine Adaptionsperiode

dar, während der die Zellen sich an das neue Substrat anheften, ausbreiten sowie Enzyme und DNA zur Zellreproduktion neu synthetisieren. Daran anschließend folgt die exponentielle Phase (*log*-Phase), in der die Zellzahl exponentiell zunimmt. In diesem Bereich lässt sich die **Populationsverdopplungszeit** der Kultur bestimmen. Gegen Ende der *log*-Phase wird die Kultur konfluent, und die Wachstumsrate ist reduziert. Hier beginnt die stationäre oder Plateau-Phase. An diesem Punkt lässt sich die **Sättigungsdichte** der Kultur berechnen. Eine Zusammenfassung über die ermittelten Wachstumsparameter der kultivierten porcinen cornealen Zellen ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

4.1.5.1. Wachstumsverhalten der cornealen Endothelzellen

Die Wachstumskurve der cornealen Endothelzellen in DMEM Wachstumsmedium unter den in Abschnitt 3.2.1. beschriebenen Kultivierungsbedingungen ist in Abbildung 4.7 dargestellt.

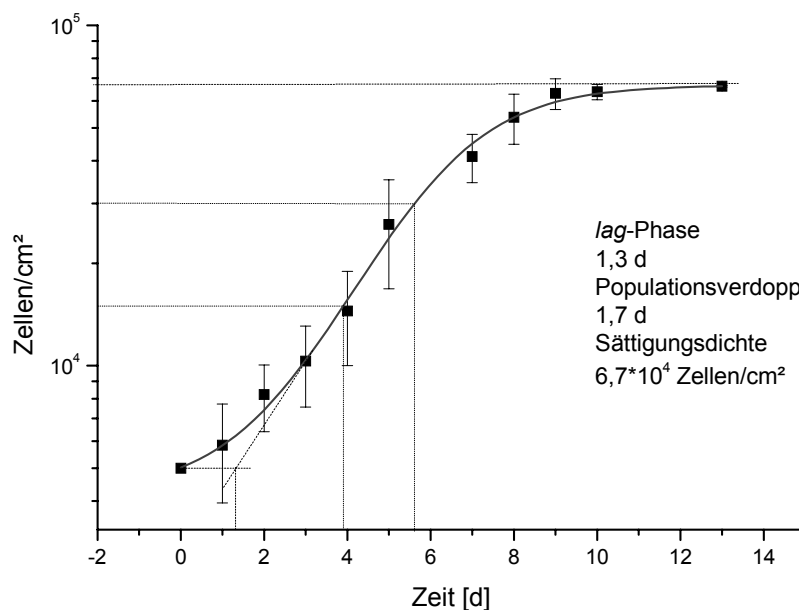


Abbildung 4.7: Wachstum der porcinen cornealen Endothelzellen in DMEM Wachstumsmedium, (n=9)

Die Abbildung 4.7 zeigt den typischen sigmoiden Verlauf des Wachstums adhärenter Zellen in einer stabilen Kultur. Nach einer durchschnittlichen Latenz-Phase von 1,3 Tagen geht die Kultur in die *log*-Phase über mit einer Populationsverdopplungszeit von 1,7 Tagen und erreicht ihr Plateau etwa 9 Tage nach Aussaat. Die Kultur zeigt weder eine stark verlängerte

Latenz-Phase, noch eine erniedrigte Populationszeit oder eine verminderte Fähigkeit zur Konfluenz bei Wachstum in DMEM Medium.

4.1.5.2. Wachstumsverhalten der cornealen Epithelzellen

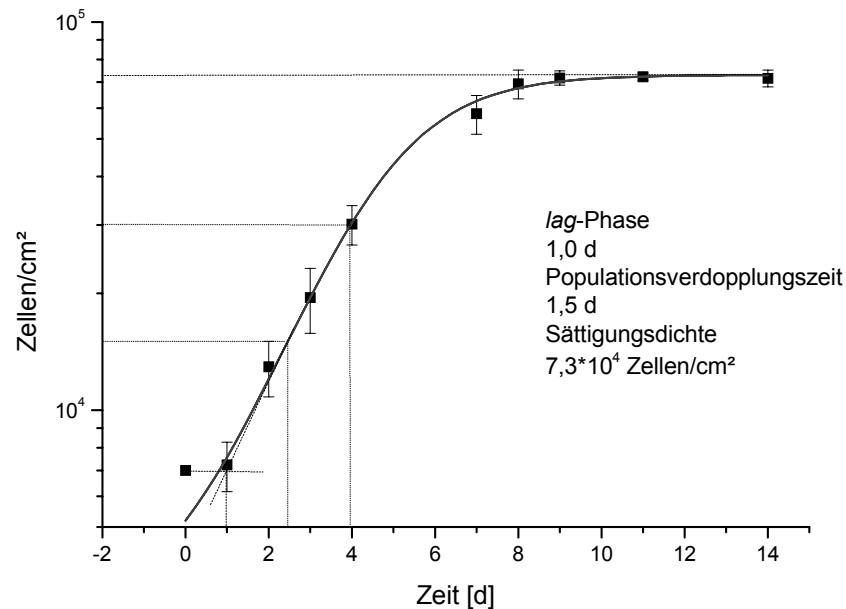


Abbildung 4.8: Wachstum der porcinen cornealen Epithelzellen in DMEM Wachstumsmedium, (n=9)

Auch die porcinen cornealen Epithelzellen zeigen offensichtlich gutes Wachstum unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 4.8). Nach einer kurzen Latenz-Phase von 1,0 Tagen zeigen die Epithelzellen im Vergleich zu den Endothelzellen eine etwas verkürzte Populationsverdopplungszeit mit 1,5 Tagen und eine etwas höhere Sättigungsdichte. Die Plateau-Phase ist nach etwa 8 Tagen erreicht.

4.1.5.3. Wachstumsverhalten der cornealen Fibroblasten

In Abbildung 4.9 ist abschließend die Wachstumskurve für die kultivierten cornealen Stromazellen dargestellt. Die Fibroblasten zeigen von den drei verschiedenen cornealen Zelltypen das stärkste Wachstum unter den gewählten Bedingungen, wenngleich die Unterschiede nicht groß sind. Während die Fibroblasten mit einer Latenz-Phase von 0,8 Tagen das beste Adaptionsvermögen der kultivierten porcinen cornealen Zellen aufweisen, beträgt die Populationsverdopplungszeit wie bei den Epithelzellen 1,5 Tagen. Die Plateau-

Phase wird ebenfalls nach etwa 8-9 Tagen erreicht, wobei die Sättigungsdichte der Fibroblasten etwas höher liegt als bei den Epithel- und Endothelzellen.

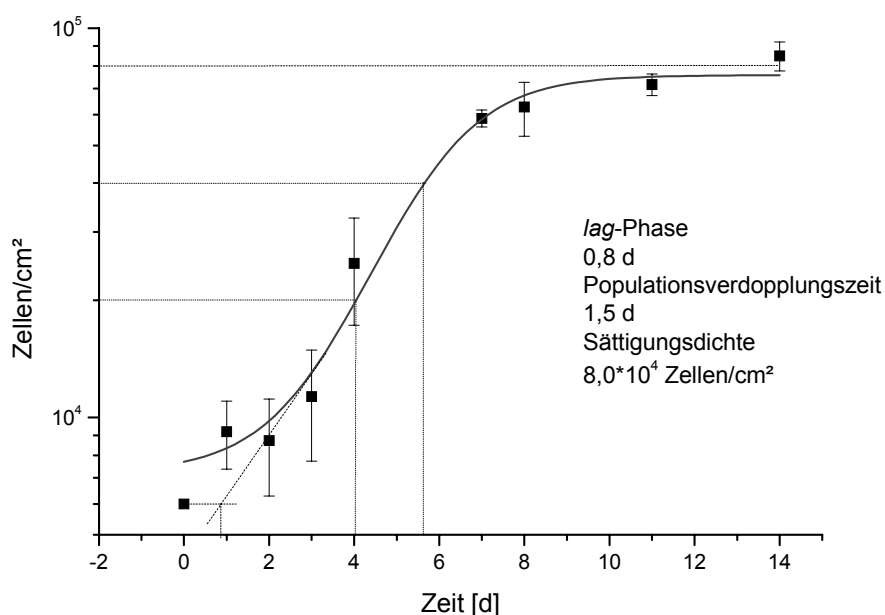


Abbildung 4.9: Wachstum der porcinen cornealen Stromazellen in DMEM Wachstumsmedium, (n=3)

	<i>lag-Phase</i> [Tage]	Populationsverdopplungszeit [Tage]	Sättigungsdichte [Zellen/cm²]
Endothelzellen	1,3	1,7	$6,7 \cdot 10^4$
Epithelzellen	1,0	1,5	$7,3 \cdot 10^4$
Fibroblasten	0,8	1,5	$8,0 \cdot 10^4$

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der ermittelten Wachstumsparameter für die Kultivierung der porcinen cornealen Zellen in DMEM Wachstumsmedium

4.1.6. Kultivierung der humanen cornealen Zellen

4.1.6.1. Humane Cornea-Epithelzellen – CEPI 17 CL 4

Bei der Zelllinie CEPI 17 CL 4 handelt es sich um eine hinsichtlich typischer Parameter, wie z.B. Expression bestimmter Keratine oder metabolischer Enzyme, genauestens charakterisierte immortalisierte Zelllinie humaner cornealer Epithelzellen [Sharif et al., 1998;

Offord et al., 1999]. Die Zellen wurden nach Erhalt schonend aufgetaut und zur Etablierung im Labor, wie unter Abschnitt 3.2.1.7.1. beschrieben, in serumfreien Medium über 3 Passagen kultiviert. Für die spätere Kokultivierung mit den anderen humanen Corneazellen in einem serumhaltigen Medium wurde die Zelllinie langsam an fetales Kälberserum adaptiert, und das Wachstumsmedium auf ein 1:1 Gemisch von Ham's F12 und DMEM umgestellt. Auch in diesem Medium zeigten die Zellen eine für transformierte Zelllinien typische, starke Proliferationsrate und eine hohe Sättigungsdichte, so dass nach weiteren 4 Passagen genug Zellmaterial für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stand. Bei der Kultivierung der Zellen im Monolayer zeigten sie im konfluenten Zustand die typische kopfsteinpflasterartige Morphologie im Lichtmikroskop (Abbildung 4.10).

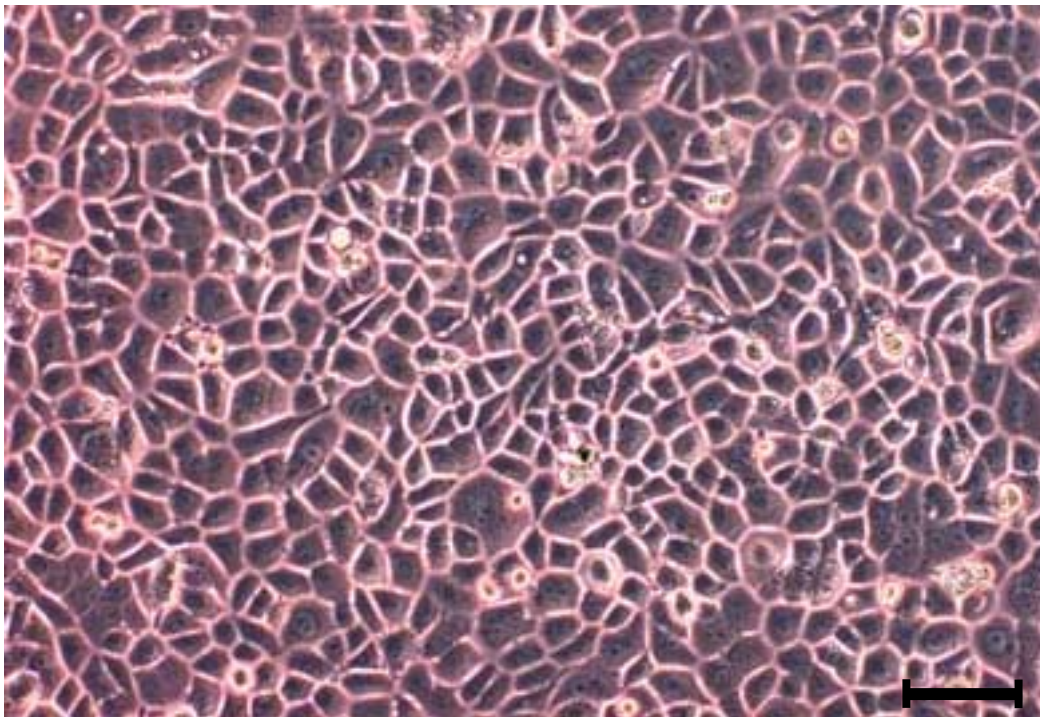


Abbildung 4.10: Humane corneale Epithelzellen CEPI 17 CL 4 als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 100 µm

4.1.6.2. Humane Cornea-Endothelzellen – HENC

Da die Isolierung und Subkultivierung humaner cornealer Endothelzellen bekanntermaßen schwierig durchzuführen ist [Engelmann und Böhnke, 1989] und aufgrund der geringen Verfügbarkeit von entsprechendem Ausgangsgewebe, wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine immortalisierte Zelllinie -HENC- eingesetzt. Hierbei handelt es sich ebenso um eine SV 40

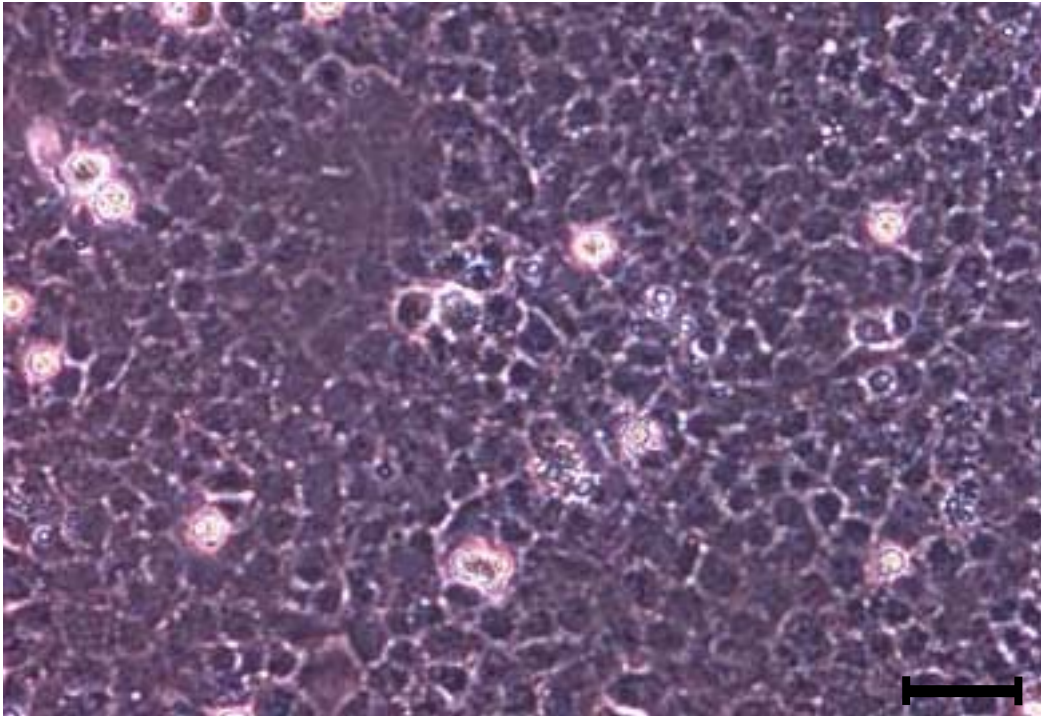


Abbildung 4.11: Humane corneale Endothelzellen HENC als konfluenter Monolayer, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 50 μm

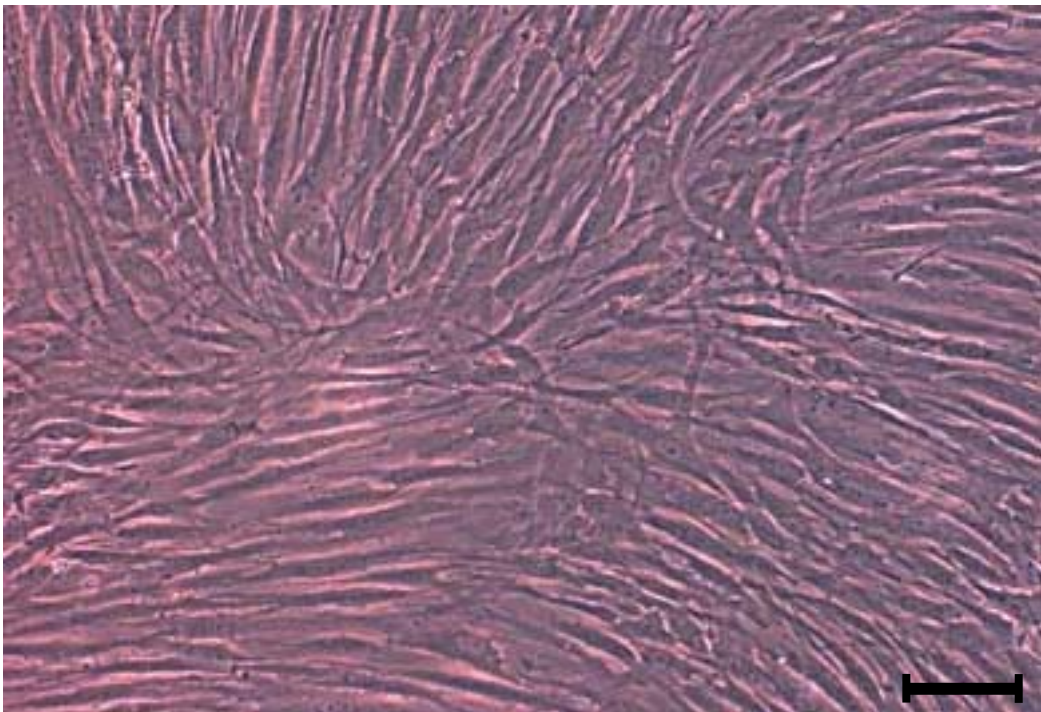


Abbildung 4.12: Humane Fibroblasten als Monolayer kultiviert, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 100 μm

transformierte Zelllinie mit einer unbegrenzten Lebensdauer [Bednarz et al., 2000]. Nach Erhalt der HENC Zellen konnten diese durch Subkultivierung im Wachstumsmedium F99 etabliert werden. Nach 5 Passagen konnte eine für die Untersuchungen hinreichend große Zellmenge erhalten werden. Die HENC Zellen sind ebenfalls durch eine starke Proliferationsfähigkeit und eine hohe Sättigungsdichte in Kultur, die zu dicht gewachsenen konfluenten Monolayern führt, gekennzeichnet. Abbildung 4.11 zeigt die HENC Zellen im konfluenten Zustand. Das morphologische Erscheinungsbild mit dicht gewachsenen hexagonalen bis polygonalen Zellen ähnelt stark den Verhältnissen in vivo.

4.1.6.3. Humane Cornea-Stromazellen

Die humanen cornealen Fibroblasten konnten genauso wie die porcinen Zellen isoliert und kultiviert werden. Sie zeigten ein ähnliches Wachstum und das gleiche langgestreckte, spindelförmige morphologische Erscheinungsbild. Im Vergleich zu den porcinen führten die humanen Fibroblasten zu etwas stabileren Kulturen. Sie konnten etwa 10 Passagen ohne erkennbaren Verlust an Proliferationskapazität oder morphologische Änderungen kultiviert werden. Das typische Erscheinungsbild der Fibroblasten ist in Abbildung 4.12 gezeigt.

4.1.7. Zusammenfassende Diskussion zur Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der cornealen Zellen

Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass es möglich ist, durch Kombination von Explantattechniken und enzymatischer Behandlung des Gewebes, reine Kulturen der drei verschiedenen Corneazelltypen zu erhalten. Die Unterschiede der einzelnen Zellarten waren deutlich am morphologischen Erscheinungsbild erkennbar und konnten immuncytochemisch durch Nachweis der unterschiedlichen Intermediärfilamente der Zellen gezeigt werden. Durch Bestimmung des Wachstumsverhaltens und der Anheftungseffizienz der porcinen Corneazellen ließ sich die Eignung von DMEM Wachstumsmedium als Kultivierungsmedium für die isolierten porcinen Zellen sowie der gewählten Bedingung zur erfolgreichen Kryokonservierung der Zellen nachweisen.

Des Weiteren konnte die Standardkultivierung der drei verschiedenen humanen cornealen Zelltypen unter Beibehaltung ihrer charakteristischen Morphologie gezeigt werden.

4.2. Entwicklung und Aufbau des organotypischen Cornea-Konstruktes

4.2.1. Entwicklung der in vitro Cornea aus porcinen cornealen Zellen

Ziel der Entwicklung war es, aus den verschiedenen Zellen der Cornea durch Rekonstruktion in vitro ein mehrschichtiges Äquivalent aufzubauen, das phänotypisch und hinsichtlich bestimmter Parameter, wie z.B. Permeationsbarriereeigenschaften, dem Originalgewebe ähnelt. Aus vorherigen Untersuchungen [Minami et al., 1993; Zieske et al., 1994, Tegtmeier, 2000] war bekannt, dass die besten Ergebnisse durch Kokultivierung der Zellen, bei gleichzeitig schrittweisem Aufbau der verschiedenen cornealen Schichten, erreicht werden können. Zweckmäßigerweise erfolgte die Kultivierung des Cornea-Konstruktes, wie in Abschnitt 3.2.2.2. beschrieben, in Transwell®-Membran Einsätzen, die es ermöglichen, das Konstrukt von oben und unten mit Medium zu versorgen bzw. das Konstrukt zur Kultivierung des mehrschichtigen Epithels an die Luft-Medium-Grenze anzuheben.

Die Endothelzellen wurden auf ein dünnes azelluläres Kollagengel aufgesät, das einerseits die Kulturen stabilisierte und andererseits ein gutes Substrat für die Zellen bildete, auf dem die Zellen schnell anhefteten und gutes Wachstum zeigten. Als Stromaäquivalent konnte eine Biomatrix, die aus Kollagen Typ I aufgebaut war und porcine Fibroblasten enthielt, auf den Endothellayer aufgebracht werden. Die Eignung eines Kollagengels in der Kultivierung dreidimensionaler dermaler oder cornealer Gewebeäquivalente ist gut untersucht [Specht, 1998; Germain et al., 1999; Orwin und Hubel, 2000]. In der weiteren Kultivierung kam es in Abhängigkeit von Kollagen- bzw. eingebrachter Fibroblastenkonzentration zu einer Kontraktion des Gels, wobei hohe Zellkonzentrationen bzw. geringere Proteinkonzentrationen die Kontraktion verstärkten [Bell et al., 1979; Guidry und Grinnell, 1985; Nishida et al., 1988]. Höhere Kollagenkonzentrationen führten zu stabileren Gelen. Die Kontraktion der Biomatrix ist ein vielbeobachtetes Phänomen, welches die Lebensfähigkeit der Fibroblasten in der Matrix zeigt, aber dessen Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Alberts et al. (1995) nehmen an, dass in einem Gelgemisch von Fibroblasten mit einem Geflecht zufallsorientierter Kollagenfibrillen die Zellen das Kollagen aus ihrer Umgebung zusammenziehen und packen, bis dieses nur noch einen Bruchteil seines ursprünglichen Volumens einnimmt.

Die aufgesäten Epithelzellen zeigten eine gute Adhärenz und Proliferation auf dem Kollagensubstrat, wie es auch bei der Standardkultivierung von cornealen Epithelzellen auf kollagenbeschichteten Kulturflaschen zu beobachten ist [Kahn et al., 1993; Schneider et al.,

1999]. Innerhalb einer Woche kam es zu einem konfluenten Layer an Epithelzellen. In Abbildung 4.13 ist der mehrschichtige Aufbau des porcinen Cornea-Konstruktes vor der weiteren Kultivierung zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels gezeigt.

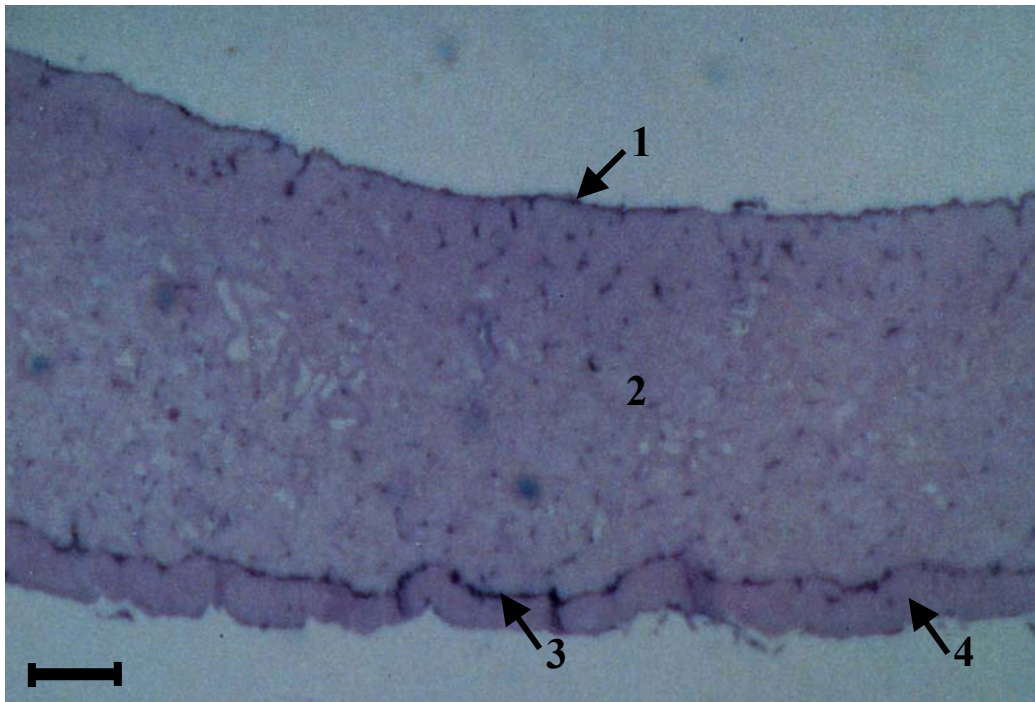


Abbildung 4.13: Übersichtsquerschnitt des porcinen Cornea-Konstruktes vor dem Anheben an die Luft-Medium-Grenze, H&E-Färbung, 1 epithelialer Monolayer, 2 Stroma-Biomatrix mit eingelagerten Fibroblasten, 3 einschichtiges Endothel, 4 azelluläres Bodengel, Balkenlänge entspricht 200 μm

Zur Ausbildung eines mehrschichtigen cornealen Epithels war es nötig, das Konstrukt an die Luft-Medium-Grenzfläche anzuheben, so dass die Versorgung des Konstruktes mit Nährstoffen nur durch Diffusion von unten erfolgte, und sich das Epithel, wie bei den Verhältnissen in vivo, in Kontakt mit der Luftumgebung befand. Dass diese Art der Kultivierung ein wichtiger Bestandteil zur Ausdifferenzierung eines mehrschichtigen Epithels ist, konnte auch hier gezeigt werden. Nur durch die Anhebung an die Luft-Medium-Grenze kam es, wie in Abbildung 4.14 zu erkennen ist, zu einem geschichteten Aufbau des Epithels. Submerse Kultivierung führte nur zu einschichtigem, bestenfalls zweischichtigem, unregelmäßig angeordnetem Epithelgewebe.

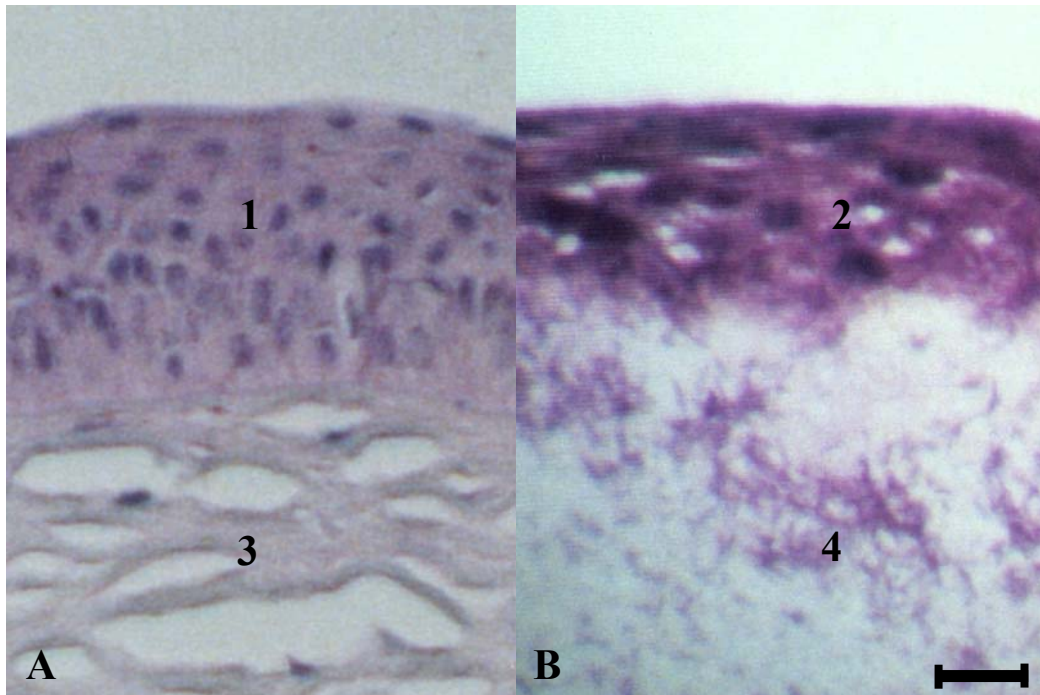


Abbildung 4.14: Vergleich des oberen Teils von **A** porciner Cornea und **B** Cornea-Konstrukt im Querschnitt, H&E-Färbung, **1,2** Epithelzellen **3** Stroma **4** Biomatrix, Balkenlänge entspricht 25 μm

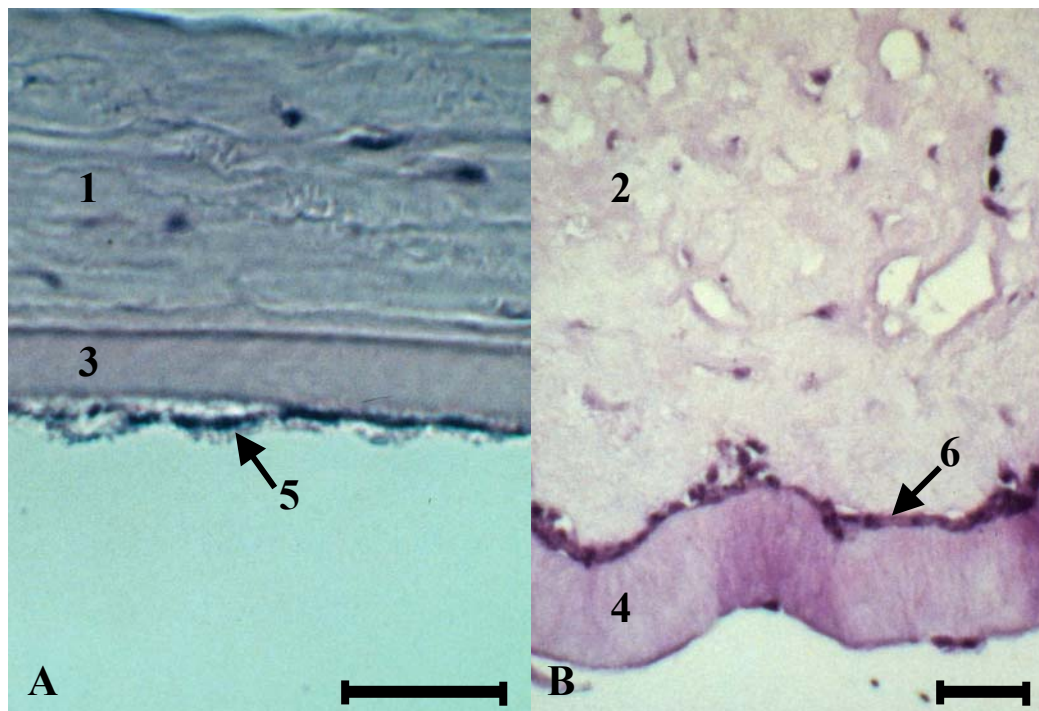


Abbildung 4.15: Vergleich des unteren Teils von **A** porciner Cornea und **B** Cornea-Konstrukt im Querschnitt, H&E-Färbung, **1** Stroma **2** Biomatrix **3** Descemet-Membran **4** Bodengel **5,6** Endothelzellen, Balkenlänge entspricht 40 μm

In Abbildung 4.14 und 4.15 sind der obere und untere Teil von Originalgewebe und Cornea-Konstrukt gegenübergestellt. Sehr deutlich ist in Abbildung 4.14 **B** das mehrschichtige Epithel des Cornea-Konstruktes zu erkennen, das im Vergleich zur exzidierten Cornea (ca. 6-8 epithelialen Schichten) nur etwa 4-5 Schichten aufweist. Im Vergleich zum Originalgewebe in Abbildung 4.14 **A** geht allerdings die klare Strukturierung in Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen etwas verloren, wenngleich die obersten Zellschichten im Cornea-Konstrukt, ähnlich wie beim Original, abgeflacht erscheinen.

In Abbildung 4.15 sind zum Vergleich die Querschnitte des unteren Teils der porcinen Original-Cornea **A** und des Cornea-Konstruktes **B** gegenübergestellt. Man erkennt in Abbildung 4.15 **A** einen Teil des Stromas mit darunter liegender Descemet-Membran und darauf anhaftende Zellen des einschichtigen Endothelgewebes. In Abbildung 4.15 **B** sind gut die strukturellen Ähnlichkeiten zum Original erkennbar. Es zeigt sich das Stromaäquivalent mit darin eingebetteten Fibroblasten. Nicht zu sehen ist eine ausgeprägte Descemet-Membran. Gut erkennbar hingegen ist das einschichtige Endothel, das zwischen Stroma-Biomatrix und dem azellulären Bodengel eingebettet liegt. Prinzipiell kann man auch hier von guten strukturellen Ähnlichkeiten im histologischen Aufbau sprechen.

4.2.2. Entwicklung der in vitro Cornea aus humanen cornealen Zellen

Unterstützt durch die erzielten Ergebnisse mit kultivierten porcinen Corneazellen war es von Interesse, ein organotypisches humanes Cornea-Konstrukt aufzubauen, um dieses mit dem bereits etablierten bovinen [Tegtmeyer, 2000] und dem entwickelten porcinen Konstrukt, insbesondere hinsichtlich der Permeationsbarriereeigenschaften, zu vergleichen. Griffith et al. (1999) konnten bereits den Aufbau eines solchen Konstruktes aus humanen Zellen zeigen, wobei es sich bei allen drei Zelltypen um transformierte Zellen handelte. Durch die Unterstützung mit transformierten humanen endothelialen und epithelialen Corneazellen (Abschnitt 3.2.1.7.) und den selbst isolierten und kultivierten nativen humanen Fibroblasten war die zelluläre Grundlage geschaffen, aufbauend auf den erzielten Erkenntnissen bei der Entwicklung des porcinen Cornea-Konstruktes, ein humanes Gewebeäquivalent für in vitro Permeationsuntersuchungen zu kultivieren.

Der Aufbau des humanen Konstruktes erfolgte äquivalent zu der Vorgehensweise mit den porcinen Zellen, wobei hier aufgrund der höheren Wachstumsrate weniger Zellen aufgesät wurden. Die humanen Endothelzellen zeigten sehr gute Anheftung und gutes Wachstum auf dem kollagenhaltigen azellulären Bodengel, so dass nach 7 Tagen ein konfluenten Monolayer

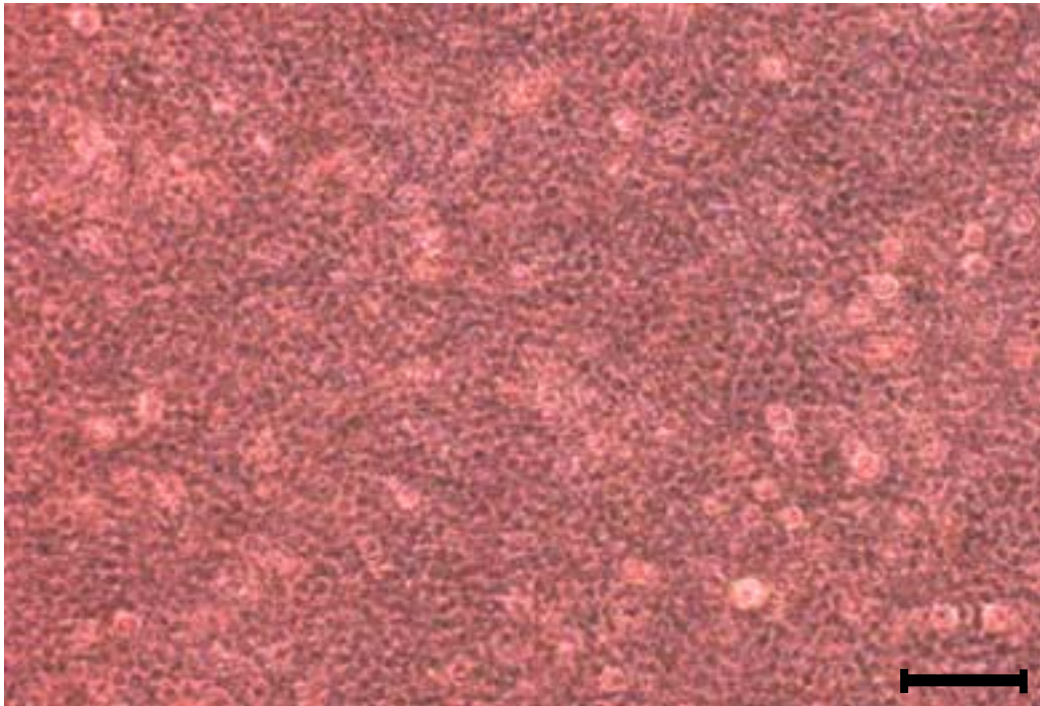


Abbildung 4.16: Kultivierte humane Endothelzellen HENC als Monolayer auf dem kollagenhaltigen Bodengel, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 100 μm

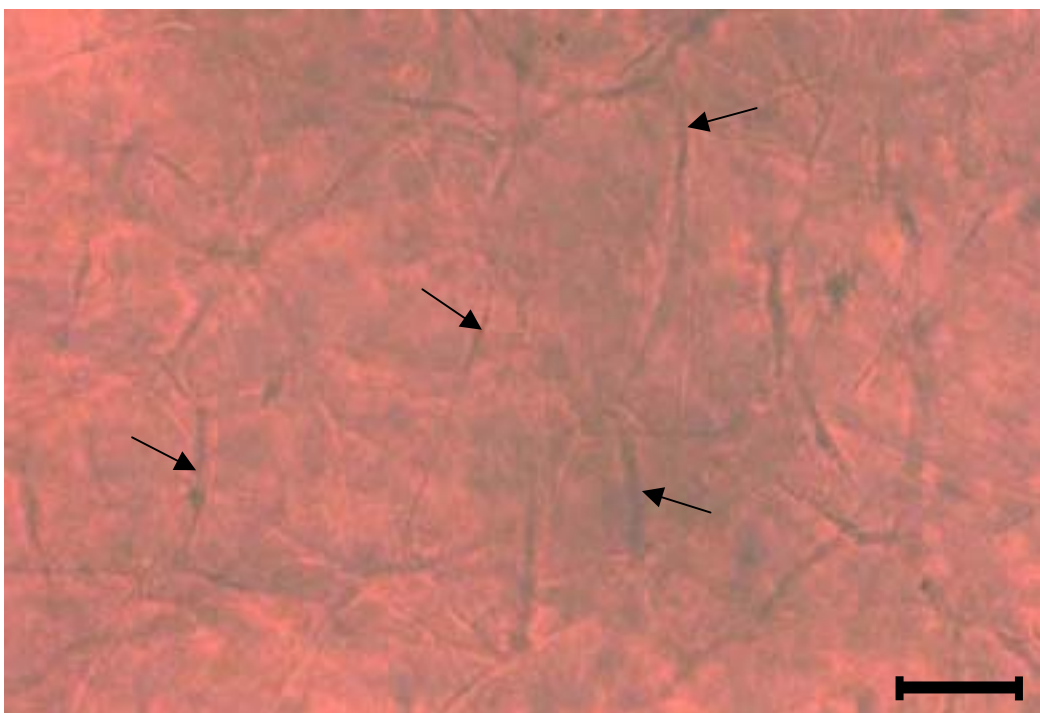


Abbildung 4.17: Humane Fibroblasten (\blacktriangleleft) eingebettet in der kollagenhaltigen Biomatrix, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 100 μm

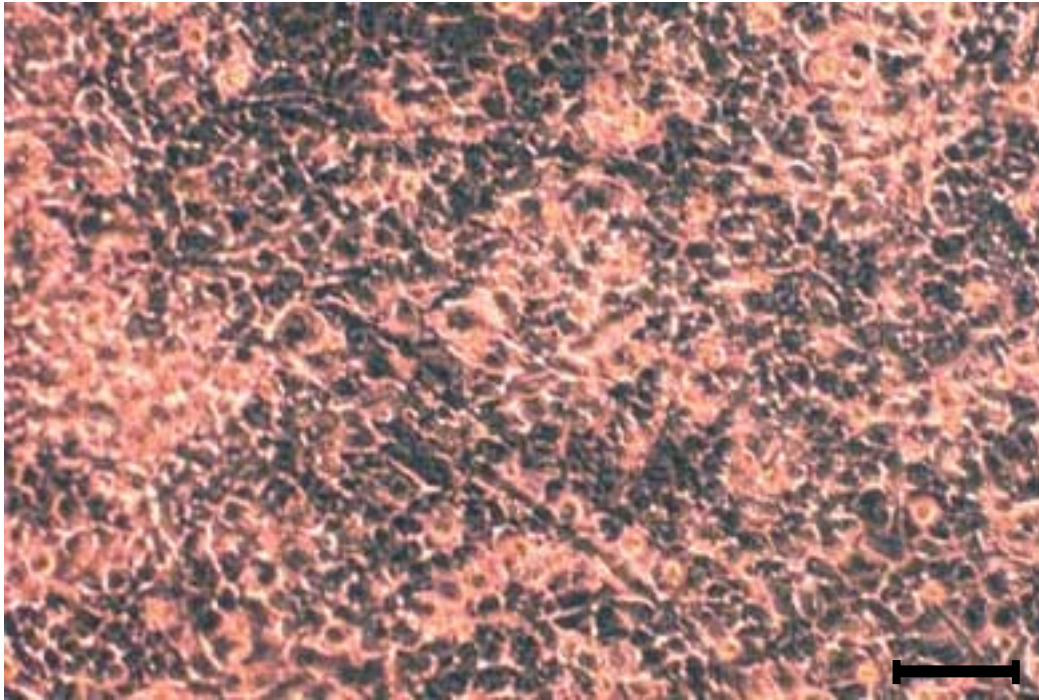


Abbildung 4.18: Humane Epithelzellen CEPI 17 CL 4 als Monolayer auf dem Stromaäquivalent, lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 100 μm

an Endothelzellen zu beobachten war. In Abbildung 4.16 ist das dichte mosaikartige Muster eines konfluenten Layers hexagonaler Zellen auf dem Bodengel zu erkennen, das sehr stark dem morphologischen Erscheinungsbild des humanen Endothels *in vivo* ähnelt.

Auf das Endothelgewebe wurde wiederum eine kollagenhaltige Biomatrix aufgebracht, die humane Fibroblasten enthielt. Ebenso kam es während der weiteren submersen Kultivierung zu einer Kontraktion des Gels, in welchem sich die Fibroblasten langgestreckt und spindelförmig ausbreiten, wobei auch hier keine Proliferation der Fibroblasten im Gel zu erkennen war. Dabei zeigen sie ein ähnliches Bild wie bei den Verhältnissen *in vivo*. Abbildung 4.17 zeigt die eingebetteten stromalen Zellen in einem Kollagengel nach 5 Tagen Kultivierungsdauer. Man kann sehr gut die ausgestreckten Fibroblasten erkennen. Die Kontraktion des Kollagengels konnte nach etwa 24 h beobachtet werden und erreichte ihren Höhepunkt etwa an Tag 4-5 nach Ausgießen des Gels. Zu einer weiteren geringfügigen Kontraktion kam es nach Aufsäen und Kultivierung der Epithelzellen auf dem Gel. Eine solche geringfügige Kontraktion wurde ebenfalls von Hibino et al. (1998) beschrieben.

Nach Aufsäen von humanen cornealen Epithelzellen kam es innerhalb kurzer Zeit zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers der Zellen auf dem Stromaäquivalent. Abbildung 4.18 zeigt das morphologische Erscheinungsbild einer dichten Epithelzellschicht nach

Kultivierung. Deutlich ist wieder ein typisch epitheliales Aussehen dieser Zellschicht auszumachen, wenngleich der Zellrasen nicht so homogene Zellformen ausbildet wie die Basalzellschicht des humanen cornealen Epithels in vivo. Durch Anhebung des Konstruktes mithilfe der Metallplatte konnte dieses wiederum an der Luft-Medium-Grenze kultiviert werden. Dies führte deutlich schneller, was wahrscheinlich auf die hohe Wachstumsrate der transformierten Zellen zurückzuführen ist, zur Ausbildung eines Multilayer, so dass sich im Vergleich zum porcinen Konstrukt eine um etwa 7 Tage verkürzte Kultivierungsperiode für das Gesamtkonstrukt ergab.

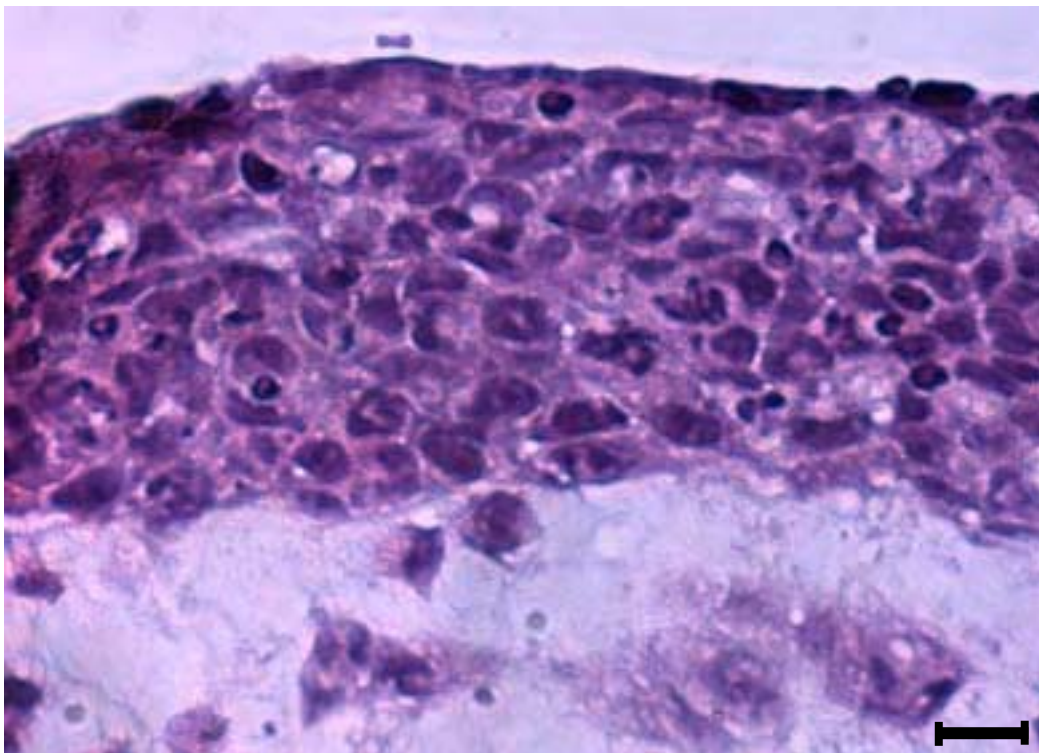


Abbildung 4.19: Querschnitt des oberen Teils eines humanen Cornea-Konstruktes, mehrschichtiges Epithel auf Stroma-Biomatrix, H&E-Färbung; Balkenlänge entspricht 25 μ m

In Abbildung 4.19 ist der histologische Querschnitt des mehrschichtigen Epithels des humanen Konstrukt zu sehen. Man erkennt mehrere Zelllagen an Epithelzellen auf der Biomatrix, wobei die Dicke des Epithels und die Anzahl der Schichten gut mit dem porcinen Originalgewebe (Abbildung 4.14) korreliert. Lediglich die klare Strukturierung in Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen geht im Vergleich zum Originalgewebe etwas verloren, so wie es auch beim porcinen Konstrukt zu beobachten war. Bemerkenswert bleibt auch hier eine Abflachung der Oberflächenzellen im Konstrukt. Im Vergleich zum Originalgewebe wird auch bei Kultivierung des humanen Konstruktes eine gute Annäherung hinsichtlich der Histologie deutlich.

4.2.3. Zusammenfassende Diskussion zur Entwicklung und zum Aufbau porciner und humaner organotypischer Cornea-Konstrukte

In den durchgeführten Untersuchungen zur Entwicklung und Kultivierung der in vitro Corneae konnten starke histologische Ähnlichkeiten der Cornea-Konstrukte mit der porcinen Cornea in vivo, insbesondere die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels, festgestellt werden, die die Annahme rechtfertigen, dass diese Gewebeäquivalente als in vitro Modelle für Permeationsuntersuchungen eingesetzt werden könnten.

Die erstmalig von Minami et al. (1993) beschriebene Methodik zur schrittweisen Rekonstruktion der Cornea unter Verwendung eines kollagenhaltigen Gels als Stromamatrix, die bei den hier durchgeführten Untersuchungen modifiziert wurde, führte sowohl im porcinen als auch humanen Cornea-Konstrukt zu der typischen, strukturierten Schichtung, wie sie bei der exzidierten Hornhaut zu beobachten ist.

Des Weiteren wurde in den Untersuchungen der Einfluss der Kultivierungsbedingungen, insbesondere das Anheben des Konstruktes an die Luft-Medium-Grenze, auf die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels festgestellt. Eine submerse Kultivierung des Gesamtkonstruktes führte nicht zu einem mehrschichtigen Epithelgewebe. Dies lässt die Annahme zu, dass eine abschließende Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze zur Erhöhung der Permeationsbarriereigenschaften des Konstruktes führen könnte. Eine solche Erhöhung der Barriereigenschaften konnten Chang et al. (2000) bei der Kultivierung von reinen Epithelzellkulturen der Kaninchencornea an der Luft-Medium-Grenze beobachten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen ergaben weiterhin, dass die Kultivierung von Endothelzellen im Konstrukt zu einem einschichtigen Gewebeband führt, das histologisch dem Originalgewebe ähnelt. Wenn auch Endothel- und Stromagewebe in den meisten Fällen nur einen geringen Anteil zur Permeationsbarriere der Cornea beitragen [Prausnitz und Noonan, 1998], so konnte doch in vorherigen Untersuchungen der Einfluss der stromalen und endothelialen Zellen bei der Kokultivierung mit epithelialen Zellen auf die Expression einer corneaspezifischen Morphologie sowie auf die Permeabilität des Epithelgewebes gezeigt werden [Zieske et al., 1994; Tegtmeier, 2000].

Diese Befunde, verbunden mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bezüglich histologischer Gemeinsamkeiten zwischen der entwickelten in vitro und der in vivo Cornea, deuten den Vorteil eines kompletten Cornea-Konstruktes für Permeationsuntersuchungen im Vergleich zu reinen epithelialen in vitro Modellen an, so dass für die weiteren Untersuchungen nur komplette dreidimensionale Corneaäquivalente verwendet wurden.

4.3. Charakterisierung der organotypischen Cornea-Konstrukte

Nachdem die Untersuchungen zur Morphologie und Histologie die Gemeinsamkeiten zwischen dem Originalgewebe und den Cornea-Konstrukten gezeigt hatten, war von Interesse, ob bei der mehrwöchigen in vitro Kultivierung der Gewebeäquivalente auch organotypische Strukturen der Cornea, wie z.B. charakteristische Keratine oder Oberflächenstrukturen, exprimiert werden. Eine solche Übereinstimmung spezifischer Parameter verleiht einem Gewebeäquivalent nicht nur Bedeutung bei Untersuchungen der Grundlagenforschung, wie z.B. Prozesse der cornealen Wundheilung [Stock et al., 1992], sondern lässt auch den Schluss zu, dass es im Zuge der Expression typischer cornealer Strukturen in vitro auch zur Ausbildung bestimmter Barriereigenschaften gegenüber ophthalmologischen Arzneistoffen kommen könnte.

Neben der Bestimmung von Komponenten der Basallamina, hier Laminin und Fibronectin, die auf die Ausbildung basalmembranähnlicher Strukturen hinweisen, wurde untersucht, ob es bei der Kultivierung des mehrschichtigen Epithels zur Expression des corneatypischen 55/64 kDa Keratinpaars kommt. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen sollten Aufschlüsse über die Ausbildung ultrastruktureller Merkmale von Epithel- und Endothelzellschichten bei der in vitro Kultivierung bringen.

4.3.1. Immunhistologischer Nachweis der Basalmembrankomponenten Laminin und Fibronectin im porcinen Cornea-Konstrukt

Bei Basalmembranen handelt es sich um eine spezialisierte Struktur der extrazellulären Matrix an der Grenzfläche zwischen Epithel- und Bindegewebe. Diese Matrix besteht aus einem Netzwerk von Kollagen, hauptsächlich Typ IV, und Glykokonjugaten. Basalmembranbestandteile sind wichtig für die Anhaftung und Ausdifferenzierung der Epithelzellen und spielen eine Rolle bei der Wundheilung nach Verletzungen des Epithelgewebes.

Die Basalmembran des cornealen Epithels besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin. Dies sind ebenfalls die Hauptbestandteile der Descemet Membran, die als Basalmembran des einschichtigen cornealen Endothels angesehen wird (Abschnitt 2.2.). Laminin und Fibronectin sind wichtige Adhäsions-Glykoproteine, die eine wesentliche Rolle bei der Anheftung der Zellen auf der Basalmembran spielen. Sie werden von den Zellen selbst gebildet.

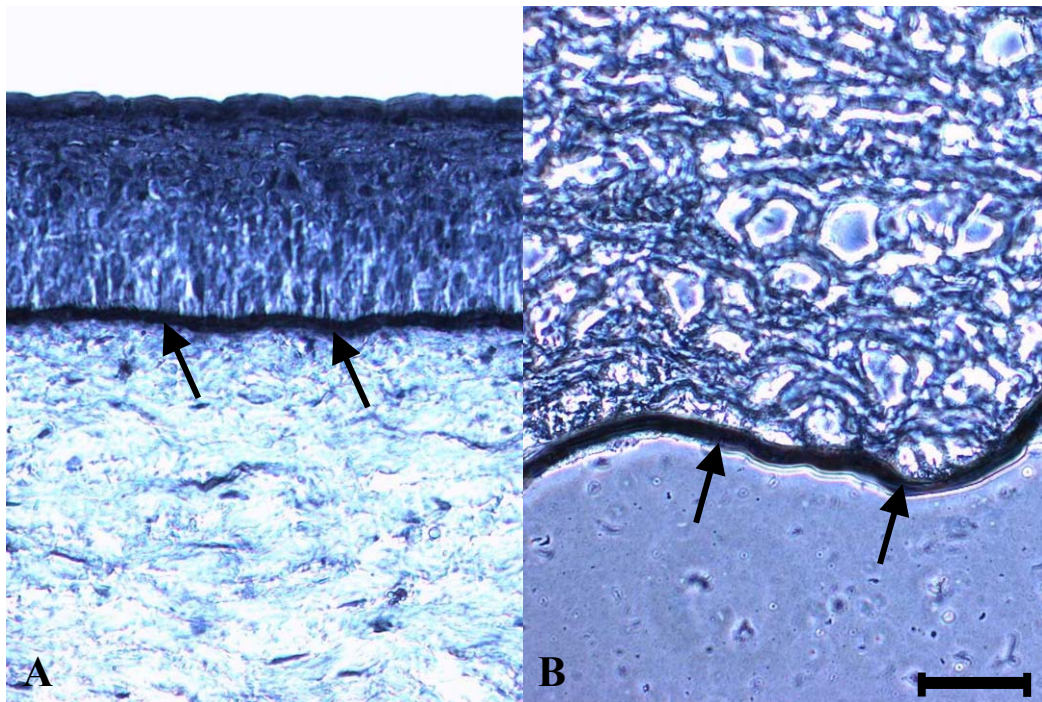


Abbildung 4.20: Nachweis von Laminin in der exzidierten porcinen Cornea, **A** Basalmembran zwischen Epithel und Stroma sowie **B** Descemet-Membran; Balkenlänge entspricht 50 μm

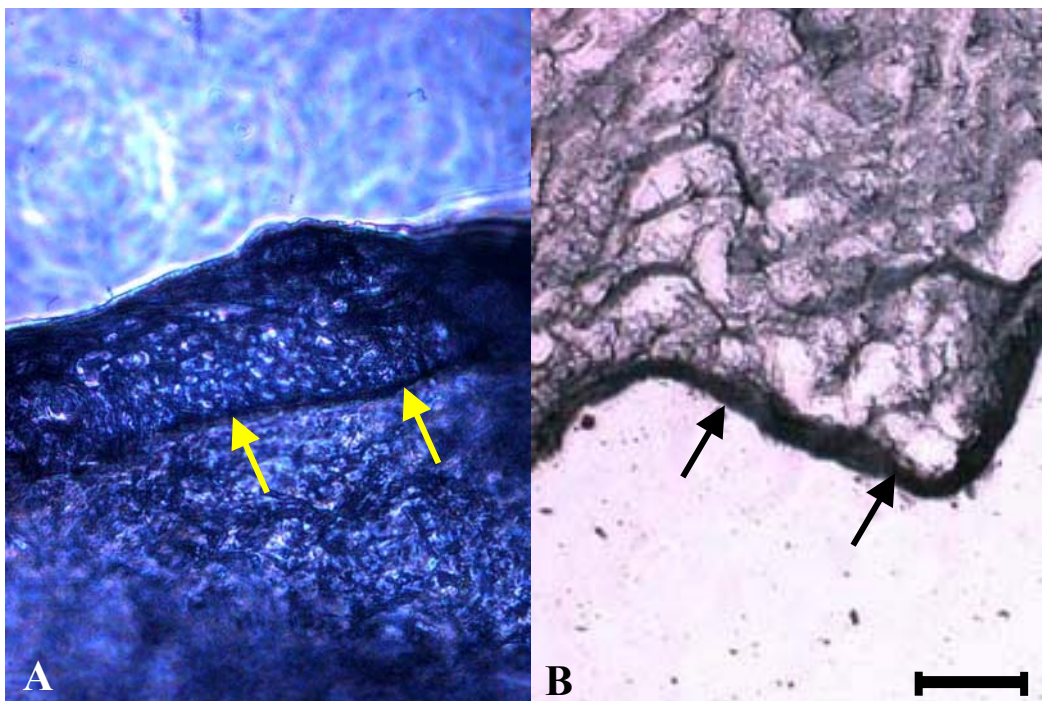


Abbildung 4.21: Nachweis von Laminin im porcinen Cornea-Konstrukt, **A** zwischen Epithel und Stroma-Biomatrix sowie **B** zwischen Stroma-Biomatrix und Endothel; Balkenlänge entspricht 50 μm

Der Nachweis der Basalmembrankomponenten Laminin und Fibronectin erfolgte immunhistochemisch. Untersucht wurde das Auftreten von Laminin und Fibronectin sowohl bei der exzidierten porcinen Hornhaut als auch beim kultivierten porcinen Cornea-Konstrukt. Bei der exzidierten porcinen Cornea zeigte sich beim Nachweis auf Laminin eine deutliche Reaktion des Gewebes mit den Antikörpern. Das Vorhandensein von Laminin war an der tiefblauen bis schwarzen Färbung der Basalmembranen zu detektieren. In Abbildung 4.20 ist Laminin als Bestandteil der Basalmembranen als eingefärbtes Band zwischen Epithel und Stroma sowie zwischen Endothel und Stroma zu sehen. Ebenfalls eine positive Reaktion auf den Nachweis von Laminin zeigte sich, wenn auch etwas schwächer, aber deutlich ausgeprägt, beim porcinen Cornea-Konstrukt. In Abbildung 4.21 ist ebenfalls die dunkle Einfärbung zwischen Epithel und Stroma-Biomatrix sowie Stroma-Biomatrix und Endothel zu erkennen.

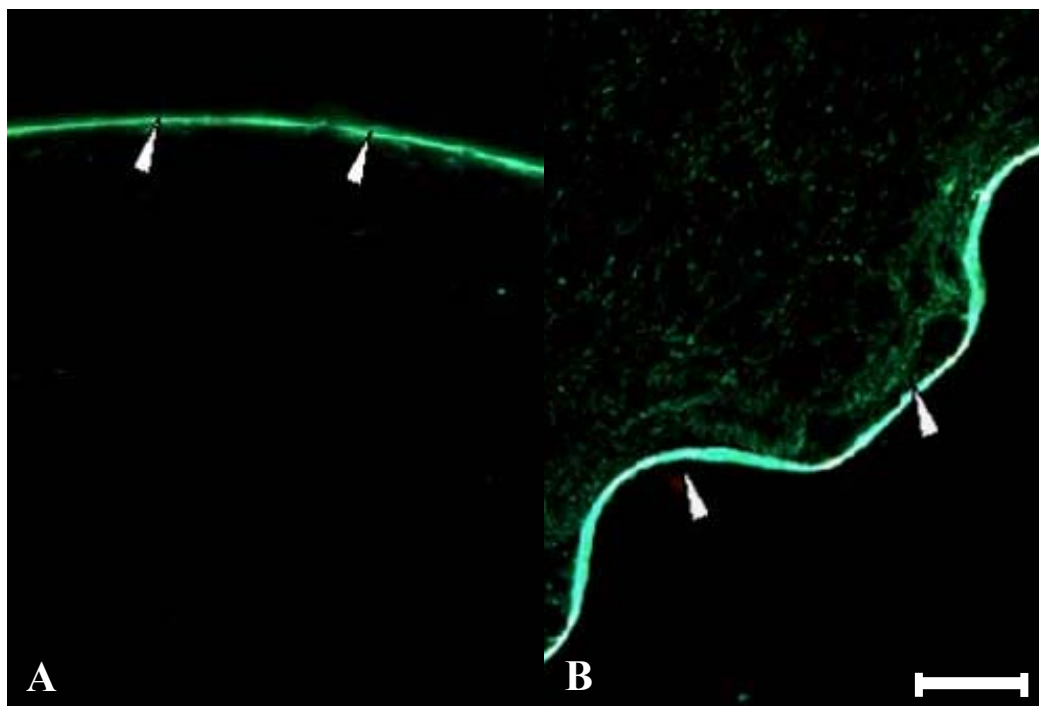


Abbildung 4.22: Nachweis von Fibronectin in der exzidierten porcinen Cornea, **A** Basalmembran zwischen Epithel und Stroma sowie **B** Descemet-Membran; Balkenlänge entspricht 50 μm

Der positive Nachweis auf Fibronectin zeigte sich im Fluoreszenz-Mikroskop als hellgrün leuchtende Lichtemission der detektierten Strukturen. Sowohl bei der exzidierten porcinen Cornea als auch beim porcinen Cornea-Konstrukt war Fibronectin nachzuweisen. Abbildung

4.22 zeigt das exzidierte Gewebe mit dem positiven Nachweis von Fibronectin als leuchtendes Band. In Abbildung 4.23 ist das kultivierte Gewebe nach Antikörper-Behandlung zu sehen. Deutlich ist auch hier eine Lichtemission zwischen Epithel und Stroma-Biomatrix sowie Endothel und Stroma-Biomatrix zu sehen, wenngleich die Färbung etwas schwächer und diffuser erscheint. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Schnitte des Cornea-Konstruktes aufgrund der geringeren Stabilität im Vergleich zum Original etwas dicker angefertigt wurden. Des Weiteren war der abschließende Waschvorgang des Gewebes nicht so effizient, da aufgrund der Fragilität des Gewebes auf stärkere mechanische Beanspruchung beim Behandeln des Gewebes verzichtet wurde.

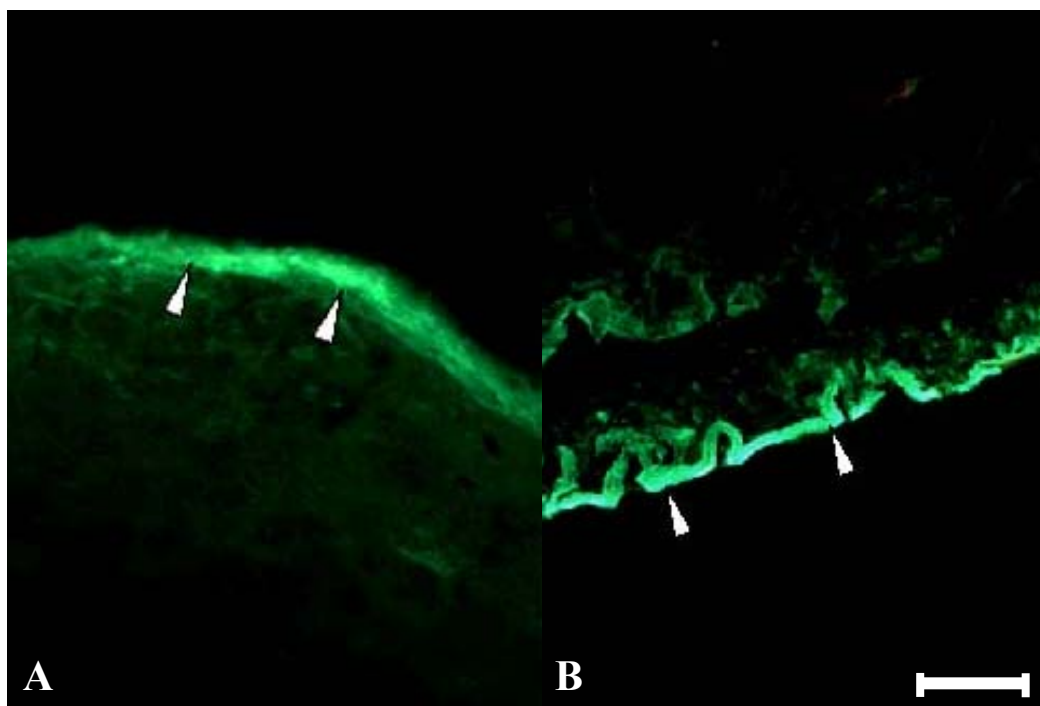


Abbildung 4.23: Nachweis von Fibronectin im porcinen Cornea-Konstrukt, **A** zwischen Epithel und Stroma-Biomatrix sowie **B** zwischen Stroma-Biomatrix und Endothel; Balkenlänge entspricht 50 μm

Bei allen Untersuchungen zeigte die Referenz ohne primären Antikörper keinen positiven Nachweis (Anfärbung oder Fluoreszenz) auf Laminin oder Fibronectin.

4.3.2. Elektrophoretische Bestimmung des Keratinmusters im epithelialen Gewebe des porcinen Cornea-Konstruktes

Seit langem ist bekannt, dass epitheliale Zellen verschiedener Herkunft aufgrund ihrer Spezialisierung und ihres Differenzierungsstatus unterschiedliche Keratine exprimieren. So ist es möglich, epitheliale Zellen ähnlicher Morphologie aufgrund ihres Keratinmusters einem Gewebeursprung bzw. einem Differenzierungsstatus zuzuordnen. Wie bereits in Abschnitt 4.1.4. erwähnt, lassen sich Keratinfilamente in Unterfamilien vom sauren und basischen Keratintyp einteilen. Moll et al. (1982) teilten die Keratine, die sich auch aufgrund ihres Molekulargewichtes unterscheiden lassen, zur Vereinheitlichung unter Nummerierung der bekannten 19 Keratine in einen Katalog ein.

Ebenso wie man in den vergangenen Jahren die spezifischen Keratine von verschiedenen Epithelien, z.B. Keratine K1 und K10 als Marker für die vollständige Differenzierung der Haut [Green, 1977] oder Keratine K4 und K13 als Marker für die Differenzierung des Ösophagus [Moll et al., 1982], untersuchte, konnten Schermer et al. (1986) die bis heute gültige Vorstellung über die corneale Differenzierung hinsichtlich des exprimierten Keratinmusters im Corneaepithel propagieren.

Schermer et al. untermauerten mit ihren Untersuchungen die Vorstellung, dass corneale Stammzellen, die sich im Limbus, dem Übergangsbereich zwischen Cornea und Conjunctiva, befinden, durch zentripetale Migration den Bereich der Cornea erreichen, wobei sie auf diesem Weg und dem anschließenden Übergang in Flügel- sowie Oberflächenzellen ein Differenzierungsprogramm durchlaufen. Sie konnten zeigen, dass ein 55/64 kDa Keratinpaar, bestehend aus dem sauren Keratin K12 mit einem M_w von 55 kDa und dem basischen Keratin K3 mit einem M_w von 64 kDa, als Marker für ein ausdifferenziertes Corneaepithel anzusehen ist [Rodrigues et al., 1987]. Sie konnten weiterhin zeigen, dass das 64 kDa Keratin K3 nicht im Bereich des Limbus, aber sehr wohl in den Basalzellen und in den nachfolgenden Entwicklungsstadien (Flügel- und Oberflächenzellen) zu finden war, was die Annahme zuließ, dass die epithelialen Corneazellen auf diesem besonderen Weg der Entwicklung vom limbalen Bereich bis zur Oberfläche der Cornea eine Differenzierung hinsichtlich ihres exprimierten Keratinmusters durchlaufen.

Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, die Proteingemische entsprechend ihrem Molekulargewicht auftrennen kann, sollte untersucht werden, welche Keratine im Epithel des Cornea-Konstruktes exprimiert werden. Nach Isolierung der Keratine mittels einer modifizierten Methode von Woodcock-Mitchell et al. (1982) wurde die SDS-PAGE nach

Laemmli (1970), wie in Abschnitt 3.2.4. beschrieben, durchgeführt, wobei der eingesetzte Molekulargewichtsstandard die Zuordnung der mit Coomassie blue eingefärbten Proteinbanden hinsichtlich des Molekulargewichts ermöglichte. Abbildung 4.24 zeigt die Aufnahme der SDS-PAGE nach Anfärbung.

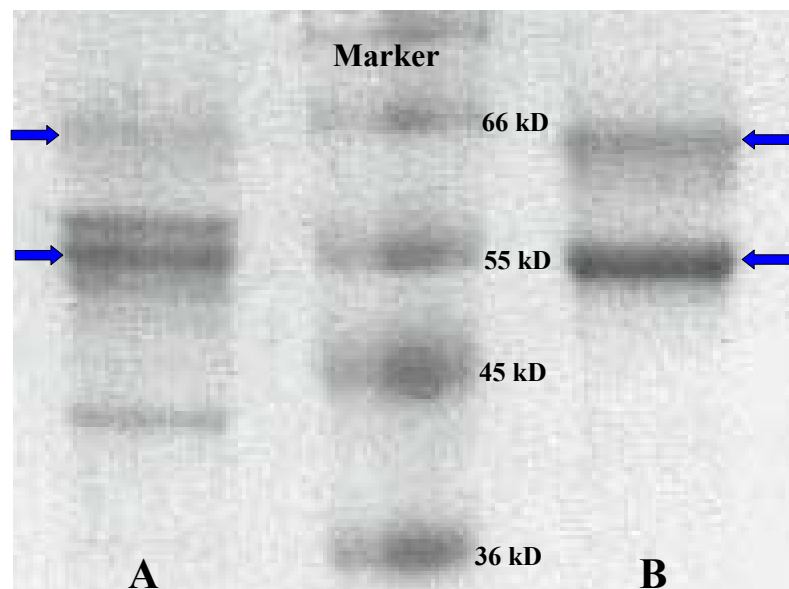


Abbildung 4.24: SDS-PAGE der extrahierten Keratine, **A** aus dem Epithel des Cornea-Konstruktes und **B** aus dem Epithel der exzidierten porcinen Cornea, (←) zeigen die Banden des 55/64 kDa Keratinpaars an

In Abbildung 4.24 **B** sind gut die beiden 55/64 kDa Banden der Keratine K12 und K3 zu sehen. Das Wiederfinden dieser beiden Hauptbanden zeigt die Ausdifferenzierung des untersuchten Corneaepithels der porcinen Exzidate an.

In Abbildung 4.24 **A** sind ebenfalls, wenn auch weniger stark ausgeprägt, die 55/64 kDa Banden zu erkennen, was gleichfalls auf eine Ausdifferenzierung des mehrschichtigen Epithels im porcinen Cornea-Konstrukt hindeutet. Neben diesen beiden Banden sind beim Cornea-Konstrukt noch weitere Banden detektierbar. Hierbei könnte es sich einmal um das 50/58 kDa Keratinpaar handeln, das ebenfalls zu kleinen Anteilen im normalen Epithel in vivo und hier hauptsächlich in den Basalzellen vorkommt [Rodrigues et al., 1987]. Schermer et al. (1986) konnten in ihren Untersuchungen an kultivierten cornealen Epithelzellen des Kaninchens ebenfalls zeigen, dass Kulturen von Basalzellen ausschließlich das 50/58 kDa Keratinpaar exprimieren. Kam es nach einiger Zeit zur Stratifizierung der Zellen, so konnte man auch die Expression des 55/64 kDa Keratinpaars in Kultur beobachten. Auch Parnigotto

et al. (1996) konnten bei ihren Untersuchungen zum Keratinmuster von kultivierten bovinen cornealen Epithelzellen ähnliche Ergebnisse zeigen.

Die in Abbildung 4.24 A dargestellten Ergebnisse lassen also vermuten, dass es nach der Kultivierung eines Monolayers an Epithelzellen im Konstrukt mit dem Anheben an die Luft-Medium-Grenze und dem Beginn des mehrschichtigen Wachstums des Epithels zur Expression des 55/64 kDa Keratinpaars und somit zu einer Ausdifferenzierung des Epithels im Cornea-Konstrukt kommt, wobei neben dem 55/64 kDa Keratinpaar auch das 50/58 kDa Keratinpaar zu finden ist.

Bei der einzelnen Keratinbande im unteren Bereich der Abbildung 4.24 A könnte es sich um das saure 40 kDa Keratin K 19 handeln, das in vielen simplen Epithelien vorkommt. Schermer et al. (1982) konnten in Kulturen von cornealen Epithelzellen des Kaninchens auch einen erhöhten Gehalt an 40 kDa Keratin K19 detektieren.

4.3.3. Western-Blot-Untersuchungen der epithelialen Keratine des porcinen Cornea-Konstruktes

Die elektrophoretischen Untersuchungen der Keratinextrakte des Epithels vom Exzidat bzw. vom Cornea-Konstrukt ergaben zwar identische Banden, die auch im Bereich von 55 bzw. 64 kDa lagen, eine exakte Identifizierung dieser Banden als Keratine ist jedoch so nicht möglich. Es könnte sich hier auch um Proteinbanden mit ähnlichem Molekulargewicht als zufällige Verunreinigungen der Keratinextrakte handeln.

Um eine zuverlässige Aussage treffen zu können, ob es sich hierbei wirklich um die Differenzierungsmarker des cornealen Epithels handelt, ist eine spezifische Identifizierung der Proteinbanden als Keratine nötig.

Eine Möglichkeit die Proteine als Keratine nachzuweisen, ist eine Reaktion mit spezifischen Antikörpern. Da dies im Polyacrylamidgel so nicht möglich ist, wird hierbei das Verfahren des Western-Blots angewendet. Dabei werden die Proteinbanden aus der SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Blotmembran übertragen, auf der eine Dekoration mit Antikörpern möglich ist [Towbin et al., 1979]. Der Erfolg des Blottens kann vor der Inkubation mit Antikörpern mithilfe einer reversiblen Ponceau-Färbung überprüft werden.

Um nun eine Aussage treffen zu können, ob es sich bei den in der SDS-PAGE erhaltenen Bande bei 64 kDa wirklich um das corneaspezifische Keratin K3 handelt, wurde ein hochspezifischer monoklonaler Antikörper AE 5 eingesetzt, der ausschließlich mit K3 reagiert [Schermer et al., 1986]. Die Elektrophorese und der Western-Blot wurden nach der

mehrstufigen Methode, wie in den Abschnitten 3.2.4. und 3.2.5. beschrieben, durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-Epithelial Keratin K3, clone AE 5, und dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper wurde das Immunblotting wiederum mittels einer Diamonobenzidin-Färbung ausgewertet. Ein positiver Nachweis an Keratin K3 sollte sich hierbei als braun gefärbte Bande auf der Transfermembran zeigen. Um nun diese Bande einem Molekulargewichtsbereich zuordnen zu können, waren auf der Membran die zuvor mit Ponceau-Orange angefärbten Banden des Markers mit Kugelschreiber markiert worden. Abbildung 4.25 zeigt die Blotmembran nach erfolgtem Immunblotting.

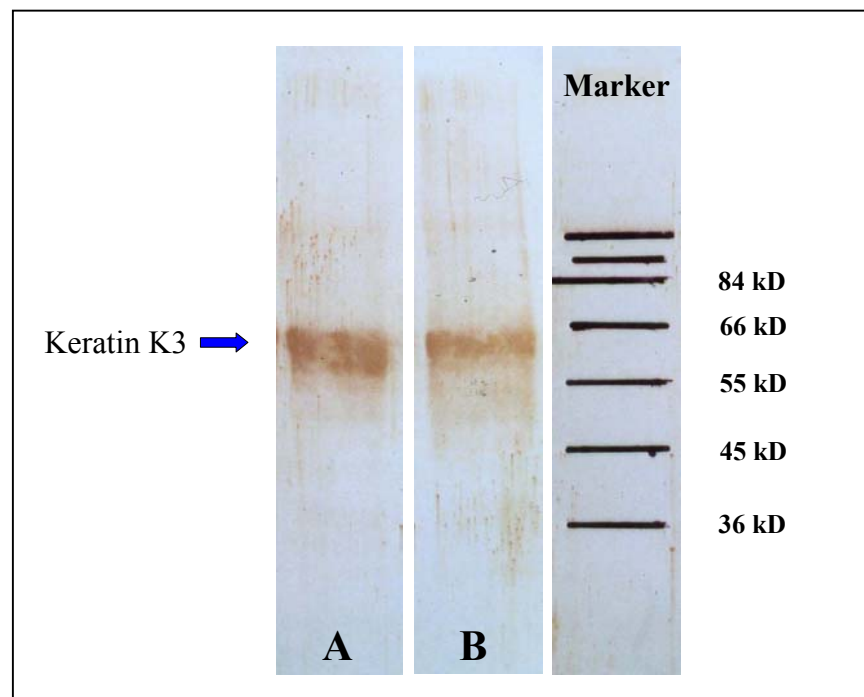


Abbildung 4.25: Transfermembran nach Immunblotting und DAB-Detektion, extrahierte Keratine **A** aus dem Epithel des Cornea-Konstruktes und **B** aus dem Epithel der exzidierten porcinen Cornea, (←) zeigt die Banden des 64 kDa Keratin K3 an

Wie in Abbildung 4.25 gut an der braunen Einfärbung der Proteinbanden mit einem M_w von 64 kDa zu erkennen ist, handelt es sich hier um das Keratin K3. Dieser Befund bestätigt die aus den Untersuchungen mittels SDS-PAGE hervorgegangene Annahme, dass es auch im Cornea-Konstrukt während der Kultivierung des mehrschichtigen Epithel zur Ausdifferenzierung der Zellen kommt.

4.3.4. Oberflächenstrukturen des porcinen und humanen Cornea-Konstruktes

Um die Oberflächenstrukturen des Epithels und des Endothels von der porcinen Cornea und den Cornea-Konstrukten zu untersuchen bzw. miteinander zu vergleichen, wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, die die dreidimensionale Analyse der Ultrastruktur von Oberflächen erlauben.

Dazu wurden die Proben entsprechend einer mehrstufigen Methodik nach Fujita et al. (1986) fixiert und zur Verbesserung der Leitfähigkeit mittels einer Tanninsäure-Osmium-Methode imprägniert, getrocknet und mit Gold besputtert. Wie in den folgenden Abbildungen zu sehen ist, ergaben die Untersuchungen im Rasterelektronenmikroskop (REM) wiederum strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen exzidiierter porciner Cornea und den Cornea-Konstrukten.

In vivo zeigen die epithelialen Oberflächenzellen der porcinen Cornea eher eine polygonale Form, sind von unterschiedlicher Größe und durch gerade, scharfe Zellgrenzen voneinander getrennt. Des Weiteren ist die Oberfläche der meisten Zellen mit unterschiedlich kurzen Mikrovilli bzw. einem charakteristischen Muster von Mikroplicae bedeckt. Hierbei handelt es sich um säulen- bzw. faltenartige Vorstülpungen der Oberflächenzellen. Sie stehen im direkten Kontakt mit dem ihnen aufgelagerten präcornealen Tränenfilm.

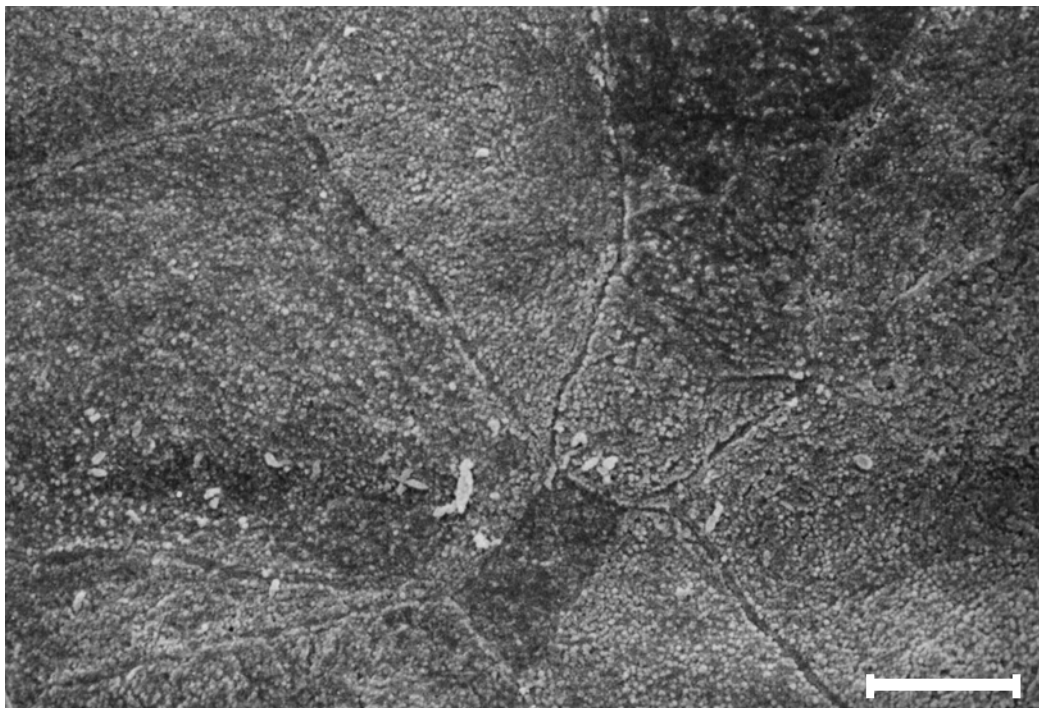


Abbildung 4.26: REM-Aufnahme vom cornealen Epithel der exzidierten porcinen Cornea; Balkenlänge entspricht 10 μm

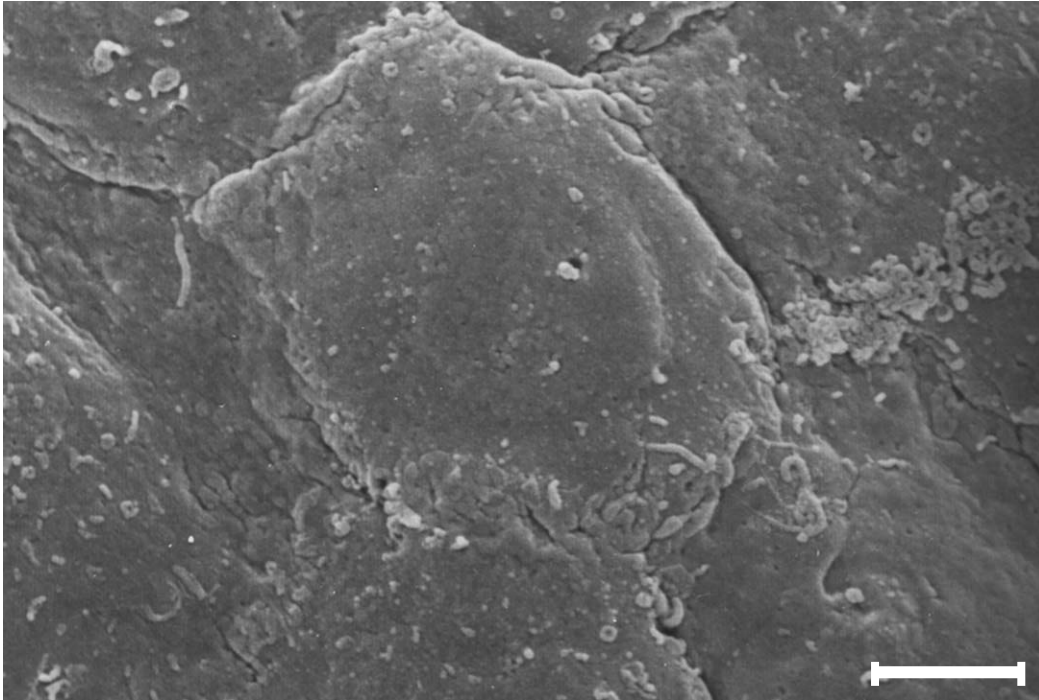


Abbildung 4.27: REM-Aufnahme vom cornealen Epithel des porcinen Cornea-Konstruktes;
Balkenlänge entspricht 10 μm

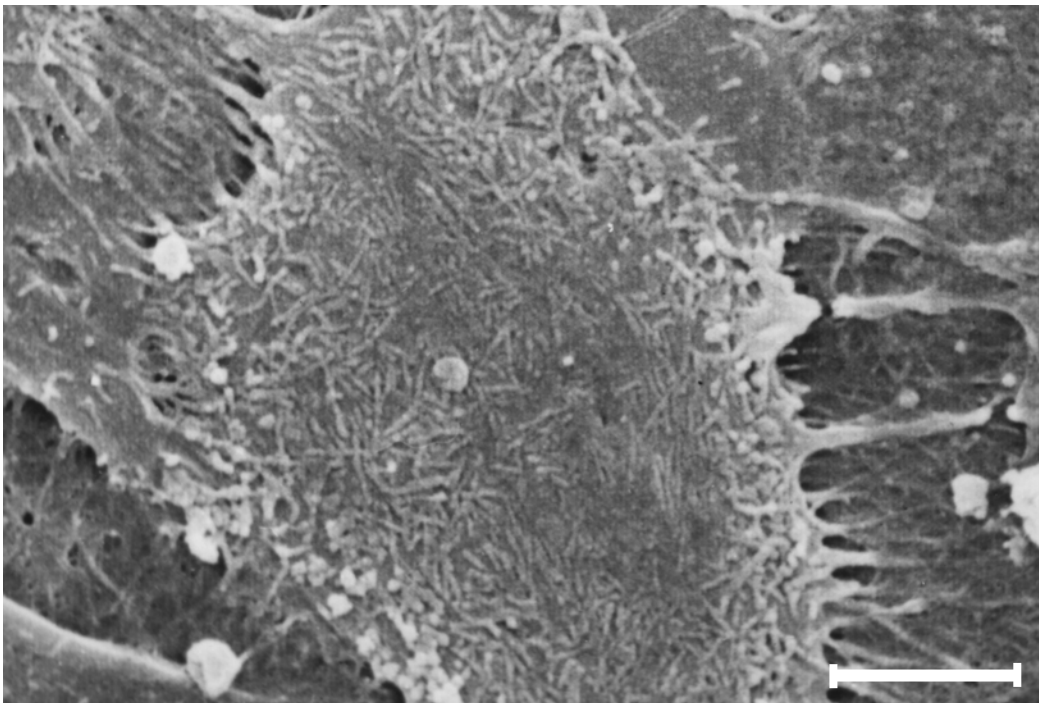


Abbildung 4.28: REM-Aufnahme vom cornealen Epithel des humanen Cornea-Konstruktes;
Balkenlänge entspricht 5 μm

In Abbildung 4.26 ist die Oberfläche des Epithels der exzidierten porcinen Cornea zu sehen. Man erkennt deutlich die stark abgeflachten Zellen mit ihren scharfen Begrenzungen. Weiterhin sind viele Mikrovilli auf den Zellen detektierbar. In der unteren Mitte der Abbildung ist ein kleiner Bereich zu erkennen, in dem es scheinbar kurz vor der Aufnahme des Bildes zur Desquamation einer Oberflächenzelle gekommen ist.

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 4.27 die Oberfläche der porcinen Cornea-Konstruktes gezeigt. Ähnlich wie bei den Verhältnissen *in vivo* erkennt man auch hier ein dichtes Epithel, wenngleich die Unterschiede auch deutlich sichtbar sind. Die Zellen erscheinen hier nicht so stark abgeflacht, und auch die Zahl der Mikrovilli ist hier deutlich geringer. Dies könnte möglicherweise auf das Fehlen des präcornealen Tränenfilmes und des natürlichen Abschilferungsprozesses zurückzuführen sein. Die Zellen treten hier stärker verzahnt auf und sind nicht so deutlich begrenzt, wie in Abbildung 4.26 zu sehen. Deutlich ist in der Mitte der Abbildung der Zellkern der Zelle zu sehen, während bei den Oberflächenzellen der Cornea *in vivo* der Zellkern stark abflacht, und in der REM-Aufnahme nicht zu sehen ist.

Ein ähnliches Bild bietet auch Abbildung 4.28, in der die Oberfläche des Epithels des humanen Cornea-Konstruktes dargestellt ist. Auch hier erscheinen die Oberflächenzellen weniger stark abgeflacht und begrenzt. Im Vergleich zum porcinen Konstrukt sind mehr Mikrovilli und Mikroplicae detektierbar. Die gesamte Oberfläche des humanen Cornea-Konstruktes ist im REM ähnlich wie bei den Verhältnissen *in vivo* und beim porcinen Konstrukt auch als dichtes Gewebe zu erkennen.

Die cornealen Endothelzellen zeigen *in vivo* eine mosaikartige Struktur. Bemerkenswert ist im Vergleich zum cornealen Epithel die recht homogene Zellgröße und -form. Der Zellschicht besteht aus einer dichten Schicht abgeflachter, stark verzahnter, meist hexagonaler oder pentagonaler Zellen. Ganz im Gegensatz zu den Epithelzellen sind hier nur wenige Mikrovilli vorhanden. Hingegen sind auf der Oberfläche der cornealen Endothelzellen Einzelcilien zu beobachten [Svedbergh und Bill, 1972; McCallum et al., 1982].

In Abbildung 4.29 ist die REM-Aufnahme des Endothels der exzidierten porcinen Cornea zu sehen. Deutlich erkennt man die meist hexagonale Struktur der Zellen. Im Vergleich zu den Epithelzellen sind nur wenige Zellausstülpungen zu erkennen. Bemerkenswert ist die starke Verzahnung der Zellen, wobei die Zellgrenzen deutlich hervorgehoben sind.

Das Bild einer dichten Schicht an Endothelzellen zeigt sich auch in Abbildung 4.30. Hier ist die REM-Aufnahme des Endothels des porcinen Cornea-Konstruktes gezeigt. Die Endothelzellen zeigen sich auch hier als dicht gewachsenes Gewebe, wohingegen die typische

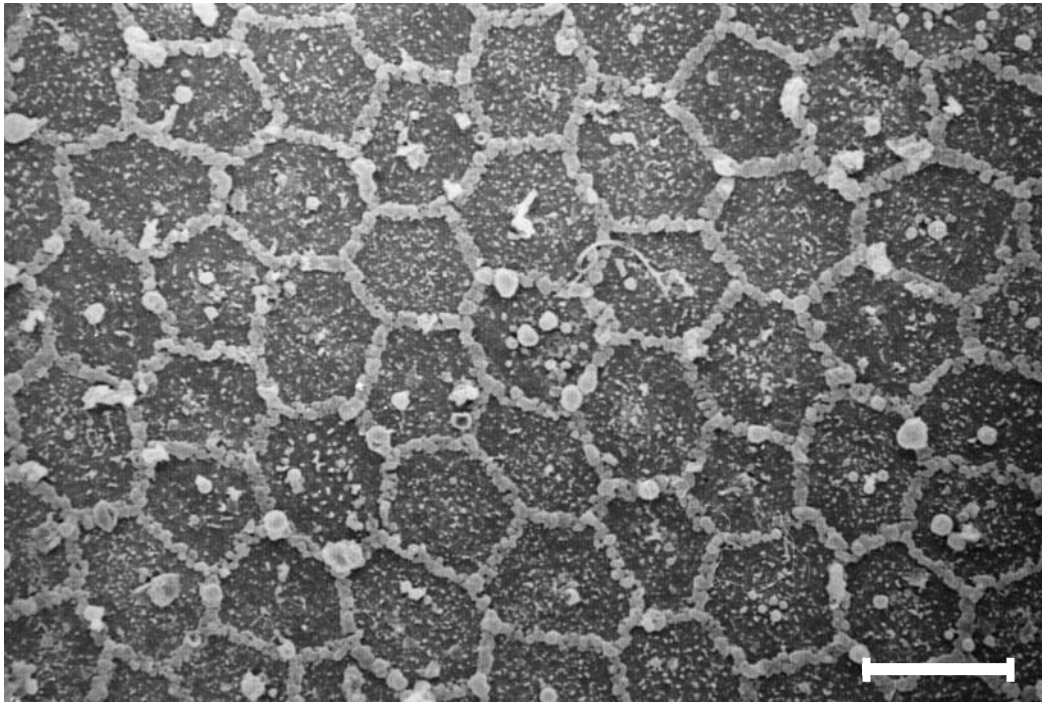


Abbildung 4.29: REM-Aufnahme vom cornealen Endothel der exzidierten porcinen Cornea;
Balkenlänge entspricht 20 μm

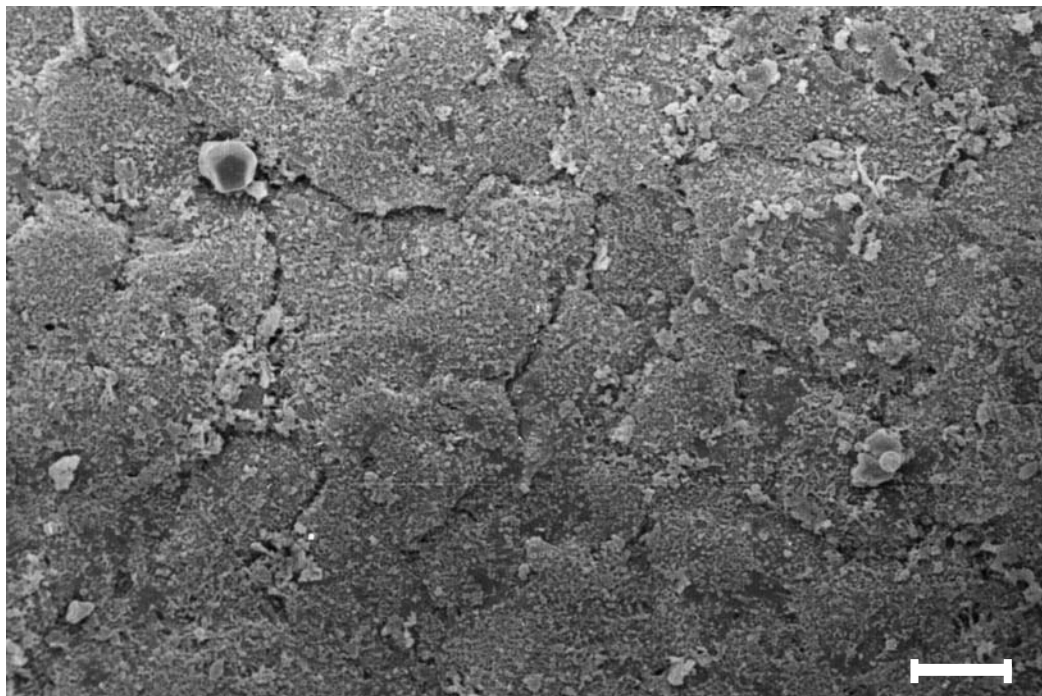


Abbildung 4.30: REM-Aufnahme vom cornealen Endothel des porcinen Cornea-Konstruktes;
Balkenlänge entspricht 20 μm

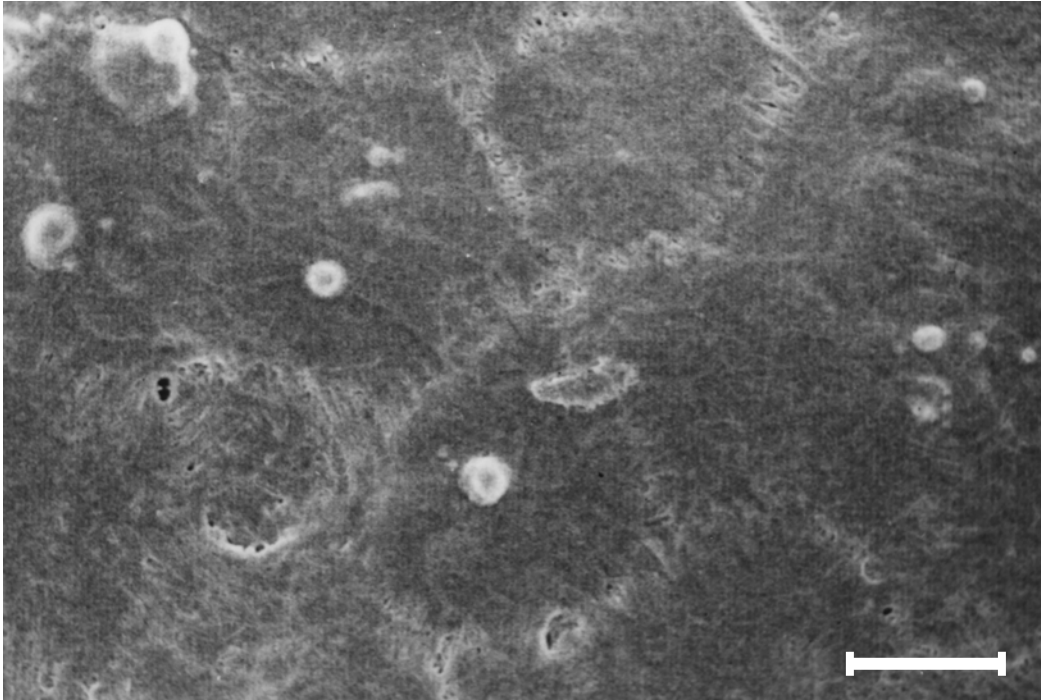


Abbildung 4.31: REM-Aufnahme vom cornealen Endothel des humanen Cornea-Konstruktes; Balkenlänge entspricht 10 μm

hexagonale Struktur der Zellen verloren geht. Auch treten die Zellgrenzen nicht so hervor, wie es bei den Verhältnissen *in vivo* zu beobachten ist. Die Zelloberfläche erscheint nicht so stark abgeflacht, doch sind auch hier Zellausstülpungen zu sehen.

Die REM-Aufnahme des Endothels im humanen Cornea-Konstrukt (Abb. 4.31) ähnelt den Verhältnissen *in vivo* stärker. Man erkennt im Mikroskop eine dichte Schicht an Endothelzellen, wobei auch hier die hexagonale bzw. pentagonale Zellform vorherrscht. Die Zellgrenzen sind deutlich erkennbar, auch wenn sie nicht ganz so stark hervortreten, wie es in Abbildung 4.29 zu beobachten ist. Ausstülpungen der Zelloberfläche sind hier seltener zu detektieren.

4.3.5. Zusammenfassende Diskussion zur Charakterisierung der organotypischen Cornea-Konstrukte

Die immunhistologischen Untersuchungen des porcinen Cornea-Konstrukts zeigen, dass die Basalmembrankomponenten Laminin und Fibronectin zwischen Epithel bzw. Endothel und der Stroma-Biomatrix vorliegen. Dies deutet daraufhin, dass unter den gewählten Kultivierungsbedingungen die Zellen in der Lage sind, bei Kultivierung auf dem angebotenen

Substrat, in diesem Fall einem Gel bestehend aus Kollagen Typ I, basalmembranähnliche Strukturen auszubilden, die die Adhäsionsproteine Laminin und Fibronectin enthalten. Zieske et al. (1994) und Schneider et al. (1999) konnten ebenfalls bei ihren Studien zur Kultivierung einer in vitro Cornea die Expression von Laminin bzw. Fibronectin zeigen.

Durch SDS-PAGE konnte das Keratinmuster des Epithels im porcinen Cornea-Konstrukt gezeigt werden. Die Untersuchungen ergaben, dass es bei der Ausbildung des mehrschichtigen Epithels in vitro ebenfalls zur Expression der 55/64 kDa Keratine K3 und K12 kommt, die als Marker der cornealen Differenzierung gelten [Schermer et al., 1986]. Im Gegensatz zur porcinen Cornea in vivo, bei der hauptsächlich diese beiden Keratintypen zu finden sind, konnte beim Cornea-Konstrukt neben einem 40 kDa Keratin, das bei der Kultivierung simpler Epithelien auftritt, vorrangig ein 50/58 kDa Keratinpaar detektiert werden, das hauptsächlich in den Basalzellen der Cornea vorkommt. Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass sich das Konstrukt zum Zeitpunkt der Bestimmung des Keratinmusters im Stadium der Umwandlung der Keratine befindet. Dass der Nachweis an K3 und K12 im Vergleich zum Corneaepithel in vivo etwas schwächer war (Abbildung 4.24), lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass diese Keratine hauptsächlich in den suprabasalen Schichten des Epithels vorliegen, die beim Cornea-Konstrukt im Vergleich zur exzidierten porcinen Cornea jedoch weniger stark ausgebildet wurden (Abbildung 4.14). Die Annahme, dass es sich bei der in der SDS-PAGE ermittelten 64 kDa Bande wirklich um das Keratin K3 handelt, konnte durch Western-Blot Untersuchungen bestätigt werden. Die Ausbildung von Keratin K3 bei der Kultivierung eines Gewebeäquivalentes, das alle drei cornealen Zelltypen enthielt und zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels an der Luft-Medium-Grenze kultiviert wurde, konnte ebenfalls von Minami et al. (1993) sowie Tegtmeier (2000) für bovine corneale Zellen und von Zieske et al. (1994) für corneale Zellen des Kaninchens gezeigt werden.

In den Untersuchungen zur Oberflächenstruktur ergaben sich wiederum Ähnlichkeiten zwischen den porcinen bzw. humanen Cornea-Konstrukten und der exzidierten porcinen Cornea. Die Tatsache, dass auch im Rasterelektronenmikroskop dichte Strukturen des Epithels zu detektieren waren, deutet darauf hin, dass die Cornea-Konstrukte ähnliche Barriereigenschaften wie Cornea-Exzidate bei in vitro Permeationsversuchen zeigen könnten. Einzig die starke Abflachung der Zellen sowie die Ausbildung zahlreicher Mikrovilli wie beim cornealen Epithel in vivo war bei den Konstrukten weniger stark ausgeprägt, was wahrscheinlich auf den fehlenden Tränenfilm und den fehlenden Lidschlag mit der damit verbundenen Desquamation der oberflächlichen Zellen zurückzuführen ist. Stärkere

Gemeinsamkeiten ließen sich beim Vergleich der Endothelien, insbesondere zwischen humanem Konstrukt und der exzidierten porcinen Cornea, feststellen. Auch hier erschienen die Zellen im Konstrukt stark verzahnt und in ihrer teils hexagonalen Zellform den Endothelzellen *in vivo* ähnlich.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Charakterisierung der Cornea-Konstrukte zeigen deutlich, dass bei der Kultivierung des Gewebeäquivalentes corneaspezifische Parameter exprimiert werden, was zu der Annahme führt, dass die Cornea-Konstrukte in weiterführenden Untersuchungen als geeigneter Ersatz der exzidierten Cornea, z.B. als *in vitro* Modelle für Permeationsuntersuchungen, eingesetzt werden können.

4.4. Permeationsuntersuchungen

Das Hauptziel der Arbeit war es, ein auf Zellkulturen basierendes organotypisches Cornea-Konstrukt zu entwickeln und dessen Verwendung als in vitro Modell für Permeationsuntersuchungen zu testen. Vorteile eines solchen Modells sind in der Unabhängigkeit von der Verfügbarkeit an Schweineaugen sowie in der Homogenität der in vitro Corneae zu sehen, die bei den exzidierten Hornhäuten der Schlachttiere nicht immer gewährleistet werden kann. Unter der Berücksichtigung, dass für die häufigsten in vitro Permeationsversuche exzidierte Hornhäute von Versuchstieren, und hier insbesondere von Kaninchen, verwendet werden, wäre die Etablierung eines solchen Modells als ein weiterer Beitrag im Sinne des Tierschutzes zu sehen.

Da die Daten aus solchen Permeationsversuchen aufgrund speziesabhängiger Faktoren nicht zwangsläufig auf den Menschen übertragbar sind (Abschnitt 2.6.), sollte aufbauend auf den Ergebnissen mit dem porcinen Cornea-Konstrukt ein humanes Gewebeäquivalent entwickelt werden, um dessen Barriereigenschaften zu untersuchen. Ein solches humanes Cornea-Konstrukt mit entsprechenden Barriereigenschaften wäre ein wertvolles Hilfsmittel, um Aussagen über die Permeation von Arzneistoffen beim Menschen treffen zu können, da in vitro Permeationsuntersuchungen mit exzidierten humanen Corneae praktisch nicht durchgeführt werden. Der Grund hierfür ist in der Nicht-Verfügbarkeit von gesunden humanen Hornhäuten zu sehen, da diese vollständig, aufgrund eines Mangels an Organspendern, zum Zwecke der Transplantation benötigt werden.

Um die Eignung organotypischer Kulturen als in vitro Modelle zu testen, erscheint es sinnvoll, die Permeation von Stoffen durch diese Kulturen zu bestimmen und mit der Permeation durch exzidiertes Gewebe zu vergleichen. Zu diesem Zweck werden häufig Mannitol und Testosteron als hydrophile bzw. lipophile Modellsubstanzen verwendet. Um den Einsatz des Cornea-Konstruktes als in vitro Modell für Permeationsuntersuchungen mit ophthalmologischen Wirkstoffen zu untersuchen, erschien die Verwendung von häufig eingesetzten, ophthalmologisch wirksamen Arzneistoffen aufgrund der Praxisnähe sinnvoller. Aus diesem Grund wurden die Permeationsuntersuchungen mit Pilocarpin, Hydrocortison und Befunolol als Modellarzneistoffen durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass mit Pilocarpinhydrochlorid und Hydrocortison analog zu Mannitol und Testosteron sowohl ein sehr hydrophiler als auch ein sehr lipophiler Arzneistoff verwendet wurde. Der logarithmierte Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log P_{\text{oct/wasser}}$ (Abschnitt 3.2.9.) betrug für Pilocarpinhydrochlorid -1,3 und für Hydrocortison 1,6 in den entsprechenden wässrigen

Formulierungen. Befunolohydrochlorid im Fertigarzneimittel Glauconex[®] nahm mit einem $\log P_{\text{oct/wasser}}$ Wert von -0,4 eher eine Mittelstellung ein.

Neben dem Einfluss der Hydrophilie/Lipophilie auf die Barriereigenschaften der Cornea-Konstrukte sollte auch der Einfluss des Vehikels auf das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Permeation bestimmt werden, da der Aspekt der Formulierung häufig Gegenstand von in vitro Permeationsuntersuchungen ist (Abschnitt 2.4.). Zu diesem Zweck wurde die Permeation der Arzneistoffe in unterschiedlichen Zubereitungen untersucht.

Für die Untersuchungen wurden sowohl Fertigarzneimittel als auch selbst hergestellte Formulierungen verwendet (Abschnitt 3.1.4.).

4.4.1. Porcines Cornea-Konstrukt

4.4.1.1. Permeationsuntersuchungen mit pilocarpinhaltigen Formulierungen durch die exzidierte porcine Cornea und das porcine Cornea-Konstrukt

Für die Untersuchungen wurden Fertigarzneimittel, die in der Glaukomtherapie eingesetzt werden, verwendet. Diese beinhalten Pilocarpinhydrochlorid bzw. Pilocarpin-Base in Konzentrationen von 2-4% (Abschnitt 3.1.4.1.). Der unterschiedliche Pilocarpin-Gehalt bei gleichen Konzentrationen an Pilocarpinhydrochlorid und Pilocarpinbase (z.B. Borocarpin[®] S enthält 2% Pilocarpinhydrochlorid vs. Pilocarpol[®] enthält 2% Pilocarpin-Base) wurde bei der Berechnung des Permeationskoeffizienten P , der zur Beurteilung der Permeationsbarriere herangezogen wurde, ebenso berücksichtigt wie die zum Teil differierenden Ausgangskonzentrationen an Arzneistoff im Fertigarzneimittel (Borocarpin[®] S enthält 2% PHCl vs. Pilogel[®] enthält 4% PHCl). Des Weiteren wurden die unterschiedlichen Dichten der Formulierungen bei der Ermittlung der Ausgangskonzentration an Arzneistoff im Donator C_0 , die zur Berechnung des Permeationskoeffizienten P herangezogen wird (Gleichung 2.3), berücksichtigt.

4.4.1.1.1. Borocarpin[®] S Augentropfen

Bei Borocarpin[®] S handelt es sich um rein wässrige Augentropfen, die zur Konservierung 0,01% Benzalkoniumchlorid enthalten. Diesem Fertigarzneimittel sind keine viskositäts-erhöhenden Hilfsstoffe zugesetzt, so dass für PHCl aus dieser Formulierung die höchste Permeationsrate erwartet wurde. Die Untersuchung der Permeabilität des Cornea-Konstruktes

mit rein wässrigen Lösungen ist von gesteigertem Interesse, da dies die häufigste Anwendungsform darstellt.

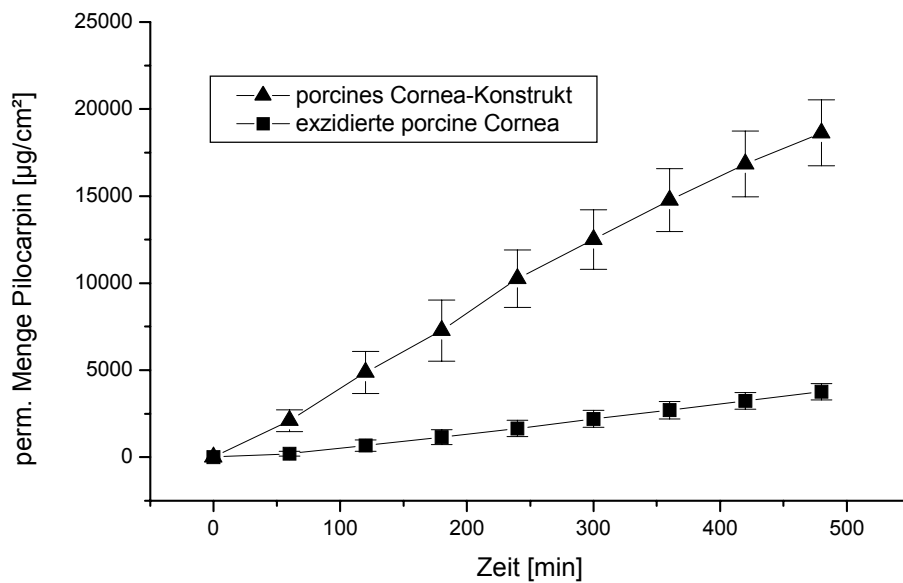


Abbildung 4.32: Permeation von PHCl aus Borocarpin® S 2% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=6) und die exzidierte porcine Cornea (n=4)

Der Permeationskoeffizient der aus dem linearen Bereich des Permeationsgraphen in Abbildung 4.32 errechnet wurde, ist aus Tabelle 4.4 ersichtlich. Eine erhöhte Permeabilität des Konstruktes im Vergleich zum Exzidat überrascht insofern nicht, als dass für die bisher beschriebenen cornealen Zellkulturmodelle immer erhöhte Permeabilitäten bei wässrigen Lösungen hydrophiler Substanzen beobachtet wurden [Suhonen et al., 2002]. Konkret zeigte sich in diesem Fall eine etwa um den Faktor 4 erhöhte Permeabilität des Cornea-Konstruktes im Vergleich zur exzidierten Cornea.

	Flux J [g/cm²·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$7,17 \cdot 10^{-7} \pm 3,08 \cdot 10^{-8}$	$35,6 \cdot 10^{-6} \pm 1,53 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$1,73 \cdot 10^{-7} \pm 1,07 \cdot 10^{-8}$	$8,57 \cdot 10^{-6} \pm 0,53 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.4: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von PHCl aus Borocarpin® S 2% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=6) und die exzidierte porcine Cornea (n=4), Mittelwert ± Standardabweichung

4.4.1.1.2. Pilogel® Augengel

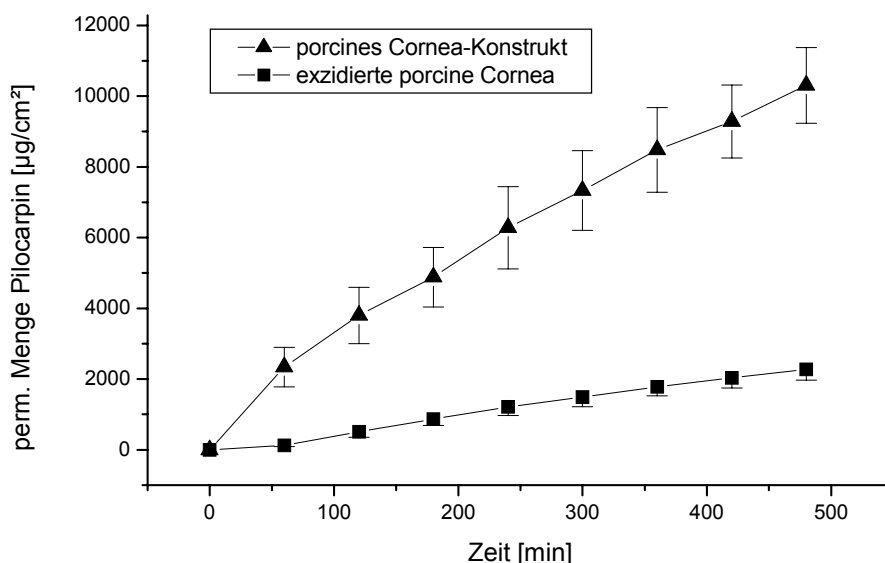


Abbildung 4.33: Permeation von PHCl aus Pilogel® 4% Augengel durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=7) und die exzidierte porcine Cornea (n=5)

Da hochviskose Hydrogele, auch auf Basis der Polyacrylsäure, als Arzneistoffträger zur Applikation am Auge weiter an Bedeutung gewinnen [Keipert, 1998], wurde die Permeation von PHCl aus einem solchen Gel bestimmt. Es zeigte sich für Pilogel®, wie in Abbildung 4.33 zu sehen ist, ein ähnliches Permeationsprofil wie bei der Permeation von Borocarpin® S. Wiederum ist eine erhöhte Permeabilität des Cornea-Konstruktes gegenüber der exzidierten Hornhaut detektierbar, während der Permeationskoeffizient für diese Zubereitung infolge der höheren Viskosität und der dadurch verlangsamten Freigabe des PHCl deutlich niedriger liegt als bei der rein wässrigen Lösung Borocarpin® S. Beim Vergleich der Permeationsbarrieren gegenüber PHCl aus Pilogel® (Tabelle 4.5) ergibt sich eine etwa um den Faktor 2,9 erhöhte Permeabilität des Konstruktes.

	Flux J [g/cm²·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$3,36 \cdot 10^{-7} \pm 2,47 \cdot 10^{-8}$	$8,03 \cdot 10^{-6} \pm 0,59 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$1,18 \cdot 10^{-7} \pm 3,77 \cdot 10^{-8}$	$2,82 \cdot 10^{-6} \pm 0,90 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.5: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von PHCl aus Pilogel® 4% Augengel durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=7) und die exzidierte porcine Cornea (n=5), Mittelwert ± Standardabweichung

4.4.1.1.3. Pilocarpol® Augentropfen

Um zu untersuchen, inwiefern ein Wechsel von wässrigen zu lipophilen Formulierungen Einfluss auf die in vitro Permeationsdaten des Cornea-Konstruktes und des Exzidates hat, wurde die Permeation von Pilocarpin bzw. PHCl aus eben solchen Grundlagen untersucht. Hierbei wurden gleichwohl eine pilocarpinhaltige, ölige Lösung (Pilocarpol® Augentropfen) als auch ein halbfestes W/O-Emulsionssystem (Spersacarpin® Augensalbe) untersucht.

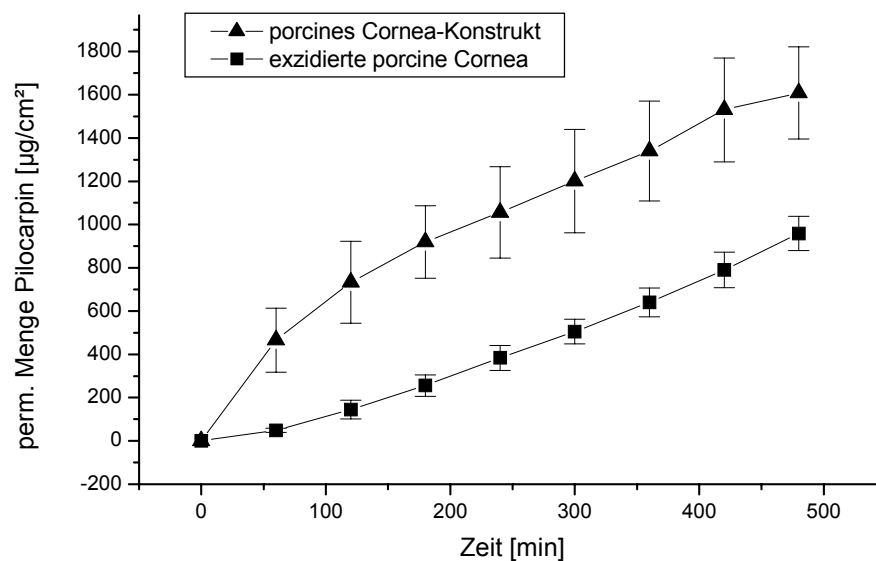


Abbildung 4.34: Permeation von Pilocarpin aus Pilocarpol® 2% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=9) und die exzidierte porcine Cornea (n=7)

Wie in Abbildung 4.34 zu erkennen ist, sind die Unterschiede zwischen Konstrukt und Exzidat bei der Permeation von Pilocarpol® geringer als bei den wässrigen Lösungen, wobei sich eine leicht erhöhte Permeabilität des Konstruktes im Vergleich zum Exzidat zeigt. Beim Vergleich der errechneten Permeationskoeffizienten (Tabelle 4.6) ergibt sich nur noch ein geringer, aber signifikanter Unterschied (*t*-Test) von Faktor 1,3.

	Flux J [g/cm²·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$4,47 \cdot 10^{-8} \pm 0,36 \cdot 10^{-8}$	$2,32 \cdot 10^{-6} \pm 0,19 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$3,45 \cdot 10^{-8} \pm 0,77 \cdot 10^{-9}$	$1,79 \cdot 10^{-6} \pm 0,04 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.6: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Pilocarpin aus Pilocarpol® 2% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=9) und die exzidierte porcine Cornea (n=7), Mittelwert ± Standardabweichung

4.4.1.1.4. Spersacarpin® Augensalbe

Bei der Spersacarpin® Augensalbe kommt es im Vergleich zu den vorherigen untersuchten Fertigarzneimitteln sowohl beim Konstrukt als auch beim Exzidat zu einer sehr deutlichen Reduktion der Permeationsrate, was aufgrund der Zusammensetzung des Vehikels erwartet werden konnte. Erstaunlicher ist der Befund, der sich aus Abbildung 4.35 und den errechneten Permeationskoeffizienten (Tabelle 4.7) ergibt. Das Cornea-Konstrukt scheint gegenüber der Augensalbe die gleiche Permeabilität zu besitzen wie das Exzidat. Der Faktor zwischen den errechneten Permeationskoeffizienten beträgt etwa 1,1.

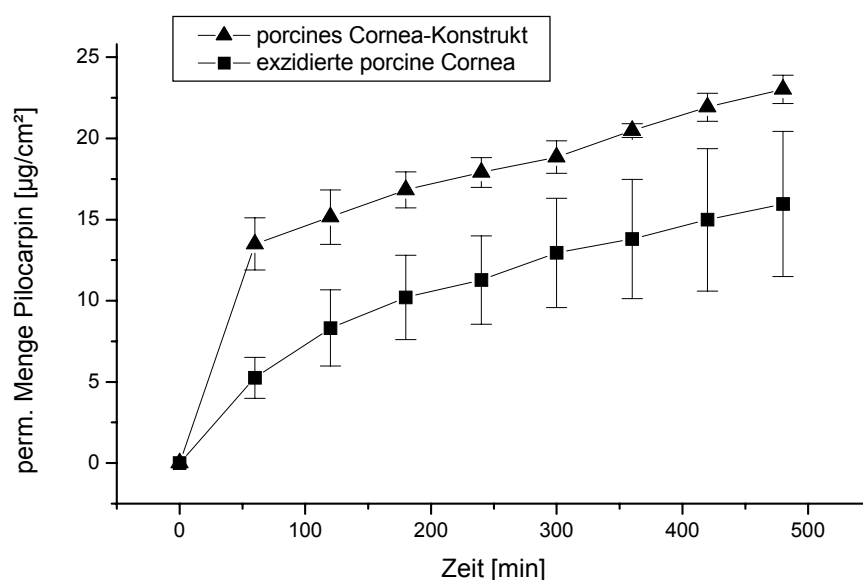


Abbildung 4.35: Permeation von PHCl aus Spersacarpin® 2% Augensalbe durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=5)

	Flux J [g/cm²·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$4,12 \cdot 10^{-10} \pm 0,51 \cdot 10^{-10}$	$2,28 \cdot 10^{-8} \pm 0,28 \cdot 10^{-8}$
exzidierte porcine Cornea	$3,60 \cdot 10^{-10} \pm 0,45 \cdot 10^{-10}$	$1,99 \cdot 10^{-8} \pm 0,25 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 4.7: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von PHCl aus Spersacarpin® 2% Augensalbe durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=5), Mittelwert ± Standardabweichung

Dies ist umso erstaunlicher, als dass bei den bisherigen Formulierungen immer erhöhte Permeabilitäten des Konstruktes ermittelt wurden. Diese sehr ähnlichen Permeationskoeffizienten könnten daraufhin deuten, dass bei dieser Formulierung der Diffusionskoeffizient kleiner als der entsprechende Permeationskoeffizient ist und somit die Freisetzung des Arzneistoffs aus der Zubereitung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird (Abschnitt 2.6.).

4.4.1.1.5. Invers mizellare Lösung IML 2%

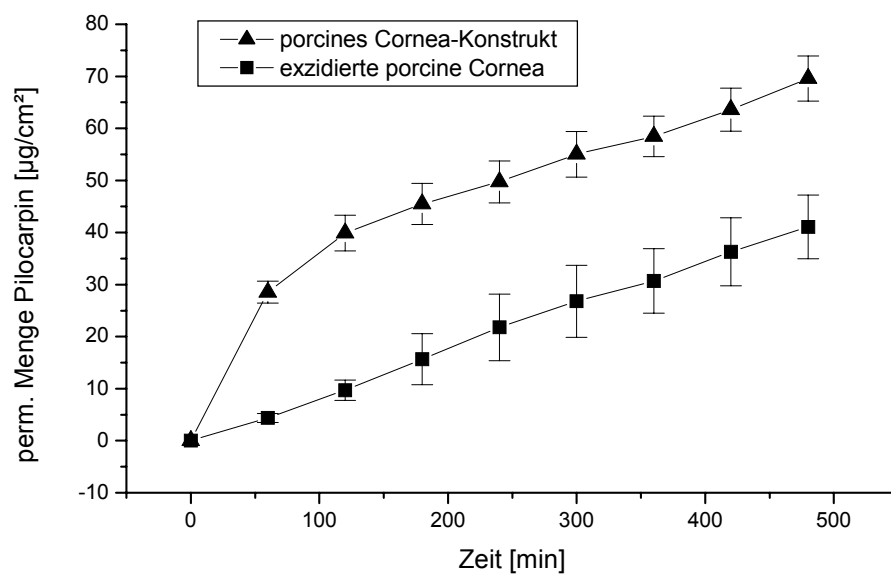


Abbildung 4.36: Permeation von PHCl aus der invers mizellaren Lösung IML 2% durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=7) und die exzidierte porcine Cornea (n=6)

Die hier als Donator eingesetzte, PHCl-haltige, invers mizellare Lösung wurde von Papantoniou (1995) entwickelt. Es handelt sich hierbei um ein System, dass nach Kontakt mit Wasser (z.B. wässriger Tränenfilm) in einen lamellaren Flüssigkristall transformiert (Abbildung 2.4) und in Folge dessen den Wirkstoff verlangsamt freigibt. Papantoniou beschreibt hierbei die Annahme der verzögernden Freisetzung von PHCl bei Applikation am Auge.

Ein ähnliches Bild wie bei der Permeation mit Spersacarpin® Augensalbe zeigt sich auch hier in Abbildung 4.36. Wiederum sind zwei Punkte auffällig. Die Permeationsrate ist gegenüber den anderen Fertigarzneimitteln, mit Ausnahme von Spersacarpin® Augensalbe, auch im Falle der IML deutlich erniedrigt. Weiterhin gibt es, wie aus Tabelle 4.8 ersichtlich wird, keinen

Unterschied zwischen den Permeationskoeffizienten des Cornea-Konstruktes und der exzidierten Cornea. Der Faktor beträgt 1,04. Dieses Ergebnis lässt wiederum den Schluss zu, dass das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der PHCl im Akzeptorkompartiment auftritt, im Fall der IML vom Diffusionskoeffizienten des Arzneistoffs im Vehikel und somit von der Freigabe aus der Formulierung bestimmt werden.

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$1,64 \cdot 10^{-9} \pm 0,18 \cdot 10^{-9}$	$9,08 \cdot 10^{-8} \pm 0,99 \cdot 10^{-8}$
exzidierte porcine Cornea	$1,59 \cdot 10^{-9} \pm 0,14 \cdot 10^{-9}$	$8,79 \cdot 10^{-8} \pm 0,77 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 4.8: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von PHCl aus der invers mizellaren Lösung IML 2% durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=7) und die exzidierte porcine Cornea (n=6), Mittelwert \pm Standardabweichung

4.4.1.1.6. Einfluss von 0,01% Benzalkoniumchlorid auf die Permeabilität der exzidierten porcinen Cornea und des porcinen Cornea-Konstruktes

Seit langem ist bekannt, dass Konservierungsmittel vom Typ der quartären Ammoniumsalze, wie z.B. Benzalkoniumchlorid (BAC), die Permeationsrate von Arzneistoffen durch die Cornea erhöhen können, was wahrscheinlich auf das zytotoxische Potential dieser Substanzen, aufgrund ihrer Interaktionen mit biologischen Membranen mit möglicher Membranruptur, zurückgeführt werden kann [Pfister und Burstein, 1976; Neville et al., 1986; Burgalassi et al., 2001]. Darüber hinaus konnten Goskonda et al. (2000) die deutliche Erhöhung der Permeabilität von transformierten cornealen Epithelzellkulturen des Kaninchens (SIRC) bei Permeationsuntersuchungen mit benzalkoniumchloridhaltigen Arzneistofflösungen im Vergleich zu konservierungsmittelfreien Lösungen zeigen. Da in Borocarpin[®] S Augentropfen 0,01% Benzalkoniumchlorid enthalten sind, sollte die Permeation mit einer konservierungsmittelfreien PHCl-haltigen Lösung (PHCl 2% OK) mit einem gleichen pH-Wert von pH 5 zeigen, ob sich Unterschiede im Permeationsverhalten des Cornea-Konstruktes und der exzidierten Cornea im Vergleich zu Borocarpin[®] S ergeben.

In Abbildung 4.37 zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Permeation mit Borocarpin[®] S (Abbildung 4.32). Das Cornea-Konstrukt weist wiederum eine höhere Permeabilität auf als

die exzidierte Cornea. Weitere Unterschiede hinsichtlich der Permeationskoeffizienten sind aus Tabelle 4.9 ersichtlich.

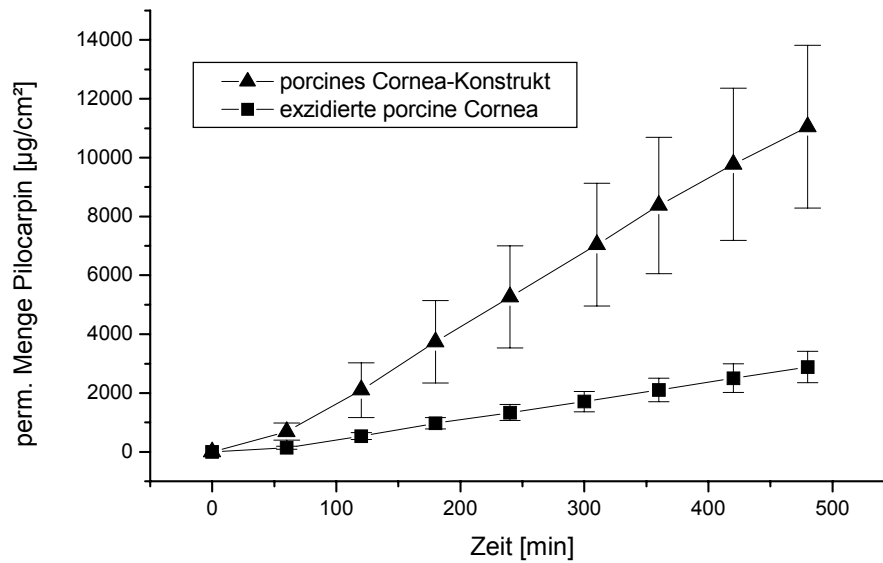


Abbildung 4.37: Permeation von PHCl aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung PHCl 2% OK durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=5)

	Flux J [g/cm²·s]		Permeationskoeffizient P [cm/s]	
	Borocarpin® S	PHCl 2% OK	Borocarpin® S	PHCl 2% OK
porcines Cornea Konstrukt	$7,17 \cdot 10^{-7}$ $\pm 3,08 \cdot 10^{-8}$	$4,49 \cdot 10^{-7}$ $\pm 1,18 \cdot 10^{-7}$	$35,6 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,53 \cdot 10^{-6}$	$22,3 \cdot 10^{-6}$ $\pm 5,86 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$1,73 \cdot 10^{-7}$ $\pm 1,07 \cdot 10^{-8}$	$1,27 \cdot 10^{-7}$ $\pm 2,31 \cdot 10^{-8}$	$8,57 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,53 \cdot 10^{-6}$	$6,33 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,15 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.9: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von PHCl aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung PHCl 2% OK sowie aus Borocarpin® S 2% Augentropfen (0,01% BAC) durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5-6) und die exzidierte porcine Cornea (n=4-5), Mittelwert \pm Standardabweichung

Beim Vergleich der Permeationskoeffizienten für Borocarpin® S und PHCl 2% OK zeigt sich deutlich die verringerte Permeabilität für PHCl bei der konservierungsmittelfreien Formulierung. Auffallend ist auch, dass bei Verwendung einer BAC-freien Lösung die Verringerung der Permeabilität um 26% für die exzidierte Cornea nur etwas geringer ist als

beim Cornea-Konstrukt mit einer Verringerung um 37%. Es zeigt sich somit ein weit geringerer Einfluss von BAC auf Konstrukt und Exzidat, als bei reinen Epithelzellkulturen, wo für 0,01% BAC eine um den Faktor 3 erhöhte Permeabilität beschrieben wurde [Goskonda et al., 2000].

Aus den Ergebnissen ergibt sich nunmehr für eine konservierungsmittelfreie PHCl-Lösung ein Unterschied in der Permeabilität von Faktor 3,5 zwischen Konstrukt und Exzidat, während für Borocarpin[®] S im Vergleich dazu ein Faktor von 4,1 ermittelt wurde (Abschnitt 4.4.1.1.1.).

Mit den Ergebnissen dieser Untersuchung zur exzidierten porcinen Cornea konnte außerdem die Übereinstimmung mit anderen, in der Literatur beschriebenen Permeationsuntersuchungen zu Pilocarpinhydrochlorid bestätigt werden, wobei nur sehr wenig Daten mit porciner Cornea existieren. Camber (1985) beschreibt für die Permeation einer konservierungsmittelfreien pilocarpinhydrochloridhaltigen wässrigen Lösung durch exzidierte porcine Cornea einen P von $6,6 \cdot 10^{-6}$ cm/s, welcher gut mit dem hier ermittelten Wert von $6,33 \cdot 10^{-6}$ cm/s für PHCl 2% OK korreliert.

4.4.1.1.7. Einfluss der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze auf die Permeabilität des porcinen Cornea-Konstruktes

Die Kultivierung organotypischer cornealer Gewebeäquivalente an der Luft-Medium-Grenze ist Voraussetzung für die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels, das morphologisch dem Originalgewebe ähnelt [Zieske et al, 1994; Tegtmeyer, 2000]. Dass zahlreiche typische corneale Parameter auch bei einer durchweg submersen Kultivierung einer in vitro Cornea exprimiert werden, konnten Schneider et al. (1999) beschreiben.

Die Permeation mit PHCl 2% OK sollte zeigen, ob Unterschiede in der Permeabilität von unterschiedlich kultivierten Konstrukten zu finden sind. Die rein submerse Kultivierung des Konstruktes hätte den Vorteil, dass das Konstrukt weniger anfällig gegen einen mikrobiellen Befall der Kulturen während der Kultivierung wäre, da der Eingriff des Hochsetzens des Konstruktes unterbleibt.

In Abbildung 4.38 sind die Permeationsverläufe für die submers bzw. an der Luft-Medium-Grenze kultivierten Cornea-Konstrukte dargestellt. Ganz offensichtlich führt die submerse Kultivierung des Konstruktes zu einer deutlichen Erhöhung der Permeabilität. Tabelle 4.10 macht deutlich, dass ein Unterschied von etwa Faktor 2 besteht. Um eine möglichst gute Annäherung der Permeationsbarriereeigenschaften des Konstruktes an das Exzidat zu

erreichen, wurde deshalb auf die submers Kultivierung verzichtet, und zur Verringerung der Permeabilität das Konstrukt weiterhin an der Luft-Medium-Grenze kultiviert.

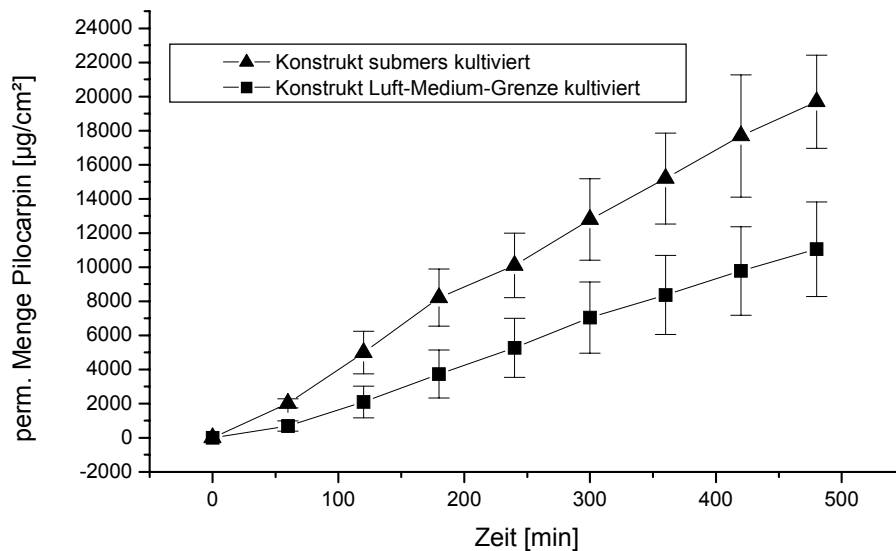


Abbildung 4.38: Permeation von PHCl aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung PHCl 2% OK durch das porcine Cornea-Konstrukt, submers (n=3) bzw. an der Luft-Medium-Grenze (n=5) kultiviert

	Flux J [g/cm²·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
Submers	$8,35 \cdot 10^{-7} \pm 1,52 \cdot 10^{-7}$	$41,5 \cdot 10^{-6} \pm 7,54 \cdot 10^{-6}$
Luft-Medium-Grenze	$4,49 \cdot 10^{-7} \pm 1,18 \cdot 10^{-7}$	$22,3 \cdot 10^{-6} \pm 5,86 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.10: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von PHCl aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung PHCl 2% OK durch das porcine Cornea-Konstrukt, submers (n=3) bzw. an der Luft-Medium-Grenze (n=5) kultiviert, Mittelwert \pm Standardabweichung

4.4.1.1.8. Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen mit pilocarpinhaltigen Formulierungen durch die exzidierte porcine Cornea und das porcine Cornea-Konstrukt

Zum direkten Vergleich sind zusammenfassend alle ermittelten Permeationskoeffizienten in Tabelle 4.11 gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass das porcine Cornea-Konstrukt im

Vergleich zur porcinen exzidierten Cornea bei den wässrigen Formulierungen (Borocarpin[®] S, Pilogel[®]) eine um den Faktor 3-4 erhöhte Permeabilität aufweist. Im Gegensatz dazu konnte bei den öligen Augentropfen (Pilocarpol[®]) nur eine geringe Permeabilitätserhöhung (Faktor 1,3) und im Falle der Augensalbe (Spersacarpin[®]) und der invers mizellaren Lösung (IML 2%) gleiche Permeationskoeffizienten festgestellt werden. Ein Zusatz des Konservierungsmittels Benzalkoniumchlorid 0,01%, wie im Falle von Borocarpin[®] S, ergibt sowohl beim Cornea-Konstrukt als auch bei der exzidierten Cornea einen etwas höheren Permeationskoeffizienten als die konservierungsmittelfreie Formulierung PHCl 2% OK. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass eine submers Kultivierung des Konstruktes zu einer Erhöhung des Permeationskoeffizienten um den Faktor 2 im Vergleich zur Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze führt.

	Permeationskoeffizient P [cm/s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
	porcines Cornea-Konstrukt	exzidierte porcine Cornea
Borocarpin [®] S 2% AT	$35,6 \cdot 10^{-6} \pm 1,53 \cdot 10^{-6}$	$8,57 \cdot 10^{-6} \pm 0,53 \cdot 10^{-6}$
Pilogel [®] 4% AG	$8,03 \cdot 10^{-6} \pm 0,59 \cdot 10^{-6}$	$2,82 \cdot 10^{-6} \pm 0,90 \cdot 10^{-6}$
Pilocarpol [®] 2% AT	$2,32 \cdot 10^{-6} \pm 0,19 \cdot 10^{-6}$	$1,79 \cdot 10^{-6} \pm 0,04 \cdot 10^{-6}$
IML 2%	$9,08 \cdot 10^{-8} \pm 0,99 \cdot 10^{-8}$	$8,79 \cdot 10^{-8} \pm 0,77 \cdot 10^{-8}$
Spersacarpin [®] 2% AS	$2,28 \cdot 10^{-8} \pm 0,28 \cdot 10^{-8}$	$1,99 \cdot 10^{-8} \pm 0,25 \cdot 10^{-8}$
PHCl 2% OK	$22,3 \cdot 10^{-6} \pm 5,86 \cdot 10^{-6}$	$6,33 \cdot 10^{-6} \pm 1,15 \cdot 10^{-6}$
PHCl 2% OK Submers	$41,5 \cdot 10^{-6} \pm 7,54 \cdot 10^{-6}$	-

Tabelle 4.11: Zusammenfassung der Permeationskoeffizienten der untersuchten Systeme für das Cornea-Konstrukt und die exzidierte Cornea, Mittelwert \pm Standardabweichung

Die Tabelle zeigt, dass das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der der Arzneistoff im Akzeptorkompartiment erscheint, für beide Permeationsbarrieren sehr ähnlich ist. Die Faktoren 3-4 beim Vergleich der Permeationskoeffizienten für die wässrigen Systeme deuten auf eine gute Annäherung der Barriereigenschaften des Konstruktes an die der exzidierten Cornea hin. Die gute Korrelation wird deutlich, wenn die Permeation durch reine corneale Epithelzellkulturen betrachtet wird. Kawazu et al. (1998) beschreiben eine um bis zu Faktor 37 erhöhte Permeabilität für verschiedene Betablocker durch kultivierte corneale Epithelzellen des Kaninchens im Vergleich zur exzidierten Kaninchen cornea. Bei

Permeationsuntersuchungen mit Phenylephrinhydrochlorid und verschiedenen Esterverbindungen von Phenylephron stellten Goskonda et al. (2000) eine um den Faktor 50-100 erhöhte Permeabilität von transformierten cornealen Epithelzellkulturen des Kaninchens (SIRC) gegenüber der exzidierten Cornea fest. Weiterhin stehen die gezeigten Ergebnisse in Einklang mit Untersuchungen, die Tegtmeier et al. (2001) durchführten. Sie konnten bei vergleichenden Permeationsuntersuchungen mit einem bovinen Cornea-Konstrukt und exzidiierter boviner Cornea für wässrige pilocarpinhydrochloridhaltige Lösungen unterschiedlicher Viskosität ebenfalls eine um die Faktoren 2-4 erhöhte Permeabilität des bovinen Cornea-Konstruktes zeigen.

Dass die öligen Augentropfen Pilocarpol[®] niedrigere Permeationskoeffizienten als die wässrigen Systeme ergeben und dass bei dieser Formulierung der Unterschied zwischen Konstrukt und Exzidat etwas geringer ausfällt, konnte sowohl beim porcinen als auch beim bovinen Konstrukt [Tegtmeier et al., 2001] festgestellt werden.

Bemerkenswerterweise konnte bei der Permeation mit Spersacarpin[®] Augensalbe und mit IML 2% ein gegenüber den anderen Fertigarzneimitteln etwa um den Faktor 100 verringerter Permeationskoeffizient für das Exzidat gefunden werden. Hier kommt es durch die Formulierung zu einer deutlichen Reduktion der Permeationsrate, was durchaus erwünscht ist. Unter Berücksichtigung der erhöhten Permeabilität des Konstruktes bei wässrigen Lösungen und der Tatsache, dass bei diesen beiden lipophilen Formulierungen für Konstrukt und Exzidat annähernd gleiche Permeationskoeffizienten gefunden wurden, kommt man zu der Annahme, dass hier der Diffusionskoeffizient in der Formulierung geringer als der Permeationskoeffizient ist, und so die Freigabe des Arzneistoffs durch die Arzneiform gesteuert wird.

Dass Benzalkoniumchlorid permeationsfördernde Eigenschaften besitzt, konnte auch hier festgestellt werden. Weiterhin zeigte sich, dass dieser Effekt sowohl beim Exzidat als auch beim Konstrukt feststellbar, aber nur mäßig ausgeprägt war. Die Tatsache, dass Goskonda et al. (2000) bei ihren Untersuchungen, wie oben beschrieben, eine um den Faktor 3 erhöhte Permeabilität der epithelialen Zellkultur für eine 0,01% BAC enthaltende Zubereitung gegenüber der konservierungsmittelfreien Lösung ermittelten, lässt den Schluss zu, dass ein komplettes Cornea-Konstrukt Vorteile gegenüber reinen Epithelzellkulturen bezüglich des Einflusses von BAC auf die Permeationbarriereigenschaften der Gewebe besitzt. Die erhöhte Empfindlichkeit von epithelialen Monolayern gegenüber cytotoxischen Noxen im Vergleich zu ausdifferenzierten Zellen im Gewebeverband kann darauf zurückgeführt werden, dass die

Eigenschaften eines kompletten Cornea-Konstruktes realitätsnäher sind als die von reinen cornealen Epithelzellkulturen.

Des Weiteren ergab sich bei den Permeationsuntersuchungen eine um den Faktor 2 erhöhte Permeabilität für Cornea-Konstrukte, die submers kultiviert wurden, gegenüber denen, die an der Luft-Medium-Grenze kultiviert wurden. Dies deutet darauf hin, dass diese besondere Art der Kultivierung nicht nur zur Ausbildung der typischen Morphologie des mehrschichtigen Epithels beiträgt, sondern auch maßgeblich die Barriereigenschaften des Gewebes erhöht. Diese Schlussfolgerung wird auch durch äquivalente Untersuchungen mit cornealem Kaninchenepithel unterstützt [Chang et al., 2000].

4.4.1.2. Permeation einer Hydrocortison Lösung HC 0,02% OK

Nachdem mit Pilocarpinhydrochlorid ein hydrophiler Arzneistoff ($\log P_{\text{oct/wasser}} -1,3$) untersucht wurde, sollte die Permeation eines ausgeprägt lipophilen Arzneistoffes überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Permeationsuntersuchungen mit einer wässrigen Lösung von 0,02% Hydrocortison ($\log P_{\text{oct/wasser}} 1,6$) durchgeführt. Aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser wurde hierbei mit einer Konzentration von 0,02% gearbeitet. Um den direkten Vergleich mit Permeationsdaten, die für PHCl 2% OK ermittelt wurden, anstellen zu können, wurde diese Lösung ebenfalls isotonisiert, sterilfiltriert und der pH auf 5 eingestellt. Ebenso wurde auf den Einsatz von Konservierungsmitteln verzichtet. In Abbildung 4.38 ist die Permeation von HC 0,02% OK durch Konstrukt und Exzidat gegenübergestellt. Ein Vergleich der Permeationskoeffizienten ist aus Tabelle 4.12 ersichtlich.

Wie aus der Abbildung ganz eindeutig zu entnehmen ist, zeigt das Konstrukt gegenüber HC wiederum eine erhöhte Permeabilität im Vergleich zum Exzidat. Die Permeationskoeffizienten sind sowohl für Konstrukt als auch Exzidat gegenüber den Werten für PHCl 2% OK deutlich reduziert (Tabelle 4.9). Der erhaltene Wert P für die Permeation von HC durch die exzidierte Cornea mit $3,07 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ deckt sich zufriedenstellend mit den in der Literatur verfügbaren Daten zur Permeation von HC durch exzidierte porcine Cornea. Camber (1985) beschreibt hierbei für P einen Wert von $4,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$.

Die erhöhte Permeabilität des Cornea-Konstruktes gegenüber der exzidierten Cornea lässt sich durch den Faktor 2,3 beim Vergleich der Permeationskoeffizienten in Tabelle 4.12 quantifizieren. Stellt man nun diesen Faktor von 2,3 dem bei der Permeation mit PHCl 2% OK erhaltene Faktor von 3,5 gegenüber, so kann man resümieren, dass sich am Beispiel PHCl und HC nur ein geringer Unterschied in der Permeabilität des Cornea-Konstruktes für

lipophile und hydrophile Substanzen zeigt. Dies führt zu der Annahme, dass das porcine Konstrukt für wässrige Lösungen in einem weiten Bereich sehr lipophiler bis sehr hydrophiler Substanzen einen sehr ähnlichen Permeationsunterschied zur exzidierten porcinen Cornea von etwa Faktor 2-4 zeigen wird.

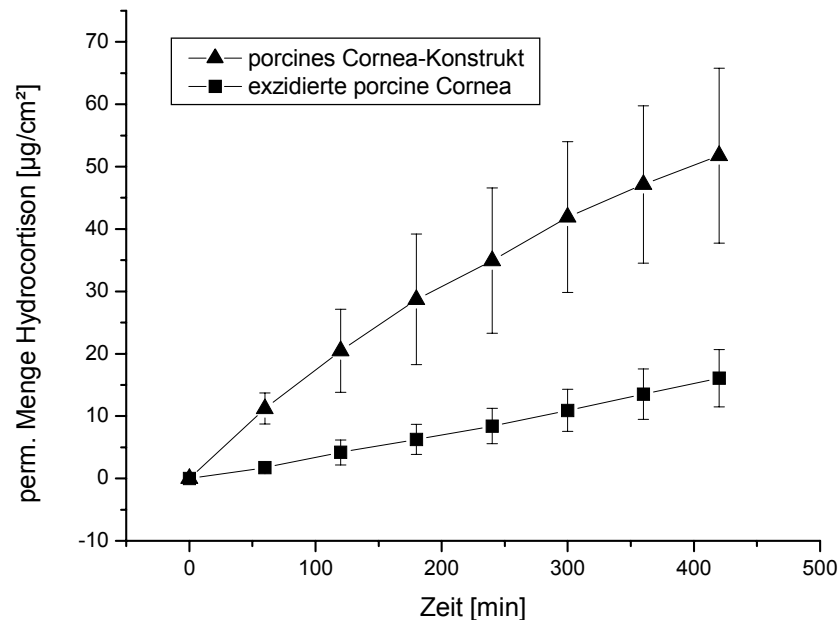


Abbildung 4.38: Permeation von Hydrocortison aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung HC 0,02% OK durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=8) und die exzidierte porcine Cornea (n=12)

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$1,42 \cdot 10^{-9} \pm 0,24 \cdot 10^{-9}$	$7,11 \cdot 10^{-6} \pm 1,21 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$0,61 \cdot 10^{-9} \pm 0,20 \cdot 10^{-9}$	$3,07 \cdot 10^{-6} \pm 0,99 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.12: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Hydrocortison aus der wässrigen Lösung HC 0,02% OK durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=8) und die exzidierte porcine Cornea (n=12), Mittelwert \pm Standardabweichung

4.4.1.3. Permeationsuntersuchungen mit befunololhaltigen Formulierungen durch die exzidierte porcine Cornea und das porcine Cornea-Konstrukt

Um diese Vermutung weiter bekräftigen zu können, wurden im Folgenden Permeationsuntersuchungen mit einem dritten Arzneistoff (Befunololhydrochlorid), der wiederum eine andere Struktur als PHCl und HC sowie einen mittleren Verteilungs-

koeffizienten von $\log P_{\text{oct/wasser}} -0,4$ aufweist, durchgeführt. In Analogie zu den pilocarpinhydrochloridhaltigen Formulierungen sollte auch hier der Einfluss des Vehikels untersucht werden, wobei neben wässrigen Augentropfen, äquivalent zu Pilogel[®] und Spersacarpin[®], ebenfalls ein wässriges Polyacrylatgel sowie ein W/O-Emulsionssystem als Grundlage eingesetzt wurde. Es wurde darauf geachtet, dass gleiche Viskositäten und Wasseranteile wie bei den Fertigarzneimitteln zur Anwendung kamen. Auf den Einsatz von Konservierungsmitteln wurde verzichtet.

4.4.1.3.1. Glauconex[®] Augentropfen

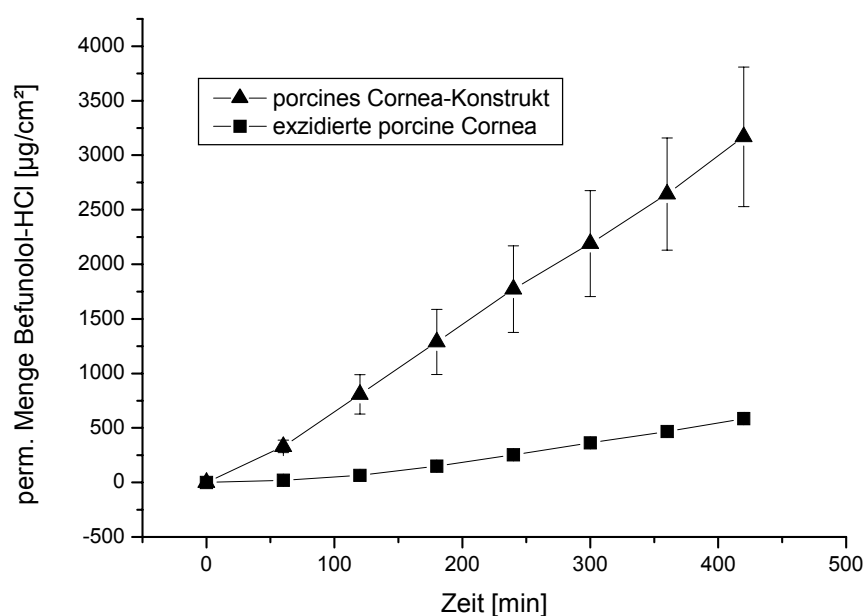


Abbildung 4.39: Permeation von Befunololhydrochlorid aus Glauconex[®] 0,5% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=5)

Bei Glauconex[®] handelt es sich um wässrige Augentropfen von Befunololhydrochlorid mit einem durch Phosphat-Puffer eingestellten pH Wert von etwa pH 7,2, in denen 0,007% Benzalkoniumchlorid als Konservierungsmittel enthalten ist.

Erwartungsgemäß konnte, wie in Abbildung 4.39 gezeigt, auch hier eine erhöhte Permeabilität des Konstruktes gegenüber dem Exzidat festgestellt werden. Beim Vergleich der Permeationskoeffizienten ergab sich ein Unterschied mit einem Faktor von etwa 4. Dies ist der gleiche Unterschied, der auch bei der Permeation mit PHCl entsprechend Borocarpin[®] S Augentropfen ermittelt werden konnte. Da es sich bei Glauconex[®] ebenfalls um mit BAC konservierte Augentropfen handelt, kann vermutet werden, dass eine

konservierungsmittelfreie Zubereitung, die nicht gesondert untersucht wurde, äquivalent wie in Abschnitt 4.4.1.1.6., zu einem Unterschied in der Permeabilität von etwa Faktor 3,5 führt.

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$1,24 \cdot 10^{-7} \pm 0,24 \cdot 10^{-7}$	$24,8 \cdot 10^{-6} \pm 4,79 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$0,30 \cdot 10^{-7} \pm 0,26 \cdot 10^{-8}$	$5,95 \cdot 10^{-6} \pm 0,52 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.13: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Befunololhydrochlorid aus Glauconex® 0,5% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=5)

Nur wenige in vitro Permeationsdaten zu Befunololhydrochlorid sind in der Literatur verfügbar. Sasaki et al. (1995) beschreiben für in vitro Permeationsuntersuchungen mit Befunolol durch die exzidierte Kaninchencornea einen Wert für P von $10,7 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die porcine Cornea aufgrund des etwas dickeren Epithelgewebes auch eine etwas stärkere Permeationsbarriere ausbildet, steht dieser Wert in guter Übereinstimmung mit dem hier für die exzidierte porcine Cornea ermittelten Wert P von $5,95 \cdot 10^{-6}$ cm/s.

4.4.1.3.2. BHCl-AG 1% Augengel

Mit Glauconex® (nur als wässrige Augentropfen) ist das einzige befunololhaltige Fertigarzneimittel auf dem deutschen Arzneimittelmarkt erhältlich, so dass zum Vergleich der Permeation mit verschiedenen Formulierungen die entsprechenden Grundlagen selbst hergestellt wurden.

In Abbildung 4.40 ist die Permeation von Befunololhydrochlorid aus dem wässrigen Polyacrylatgel durch das Konstrukt und das Exzidat zu sehen. Auch hier zeigt sich wieder die erhöhte Permeabilität des Konstruktes im Vergleich zum Exzidat. Die entsprechenden aufbereiteten Permeationsdaten sind in Tabelle 4.14 dargestellt.

Es zeigt sich ein Unterschied von Faktor 2,7 in der Permeabilität zwischen Cornea-Konstrukt und exzidierter Cornea. Auch dies ist in Übereinstimmung mit den ermittelten Werten für PHCl, in diesem Fall Pilogel® (Abschnitt 4.4.1.1.2.), wobei mit Pilogel® ein Faktor von 2,9 erhalten werden konnte. Der etwas geringere Unterschied im Vergleich zwischen Konstrukt

und Exzidat im Fall von BHCl-AG 1% Augengel mit Faktor 2,7 zu Pilogel[®] beruht vermutlich darauf, dass in BHCl-AG 1% Augengel im Gegensatz zu Pilogel[®] (0,0088% BAC) kein Benzalkoniumchlorid enthalten ist.

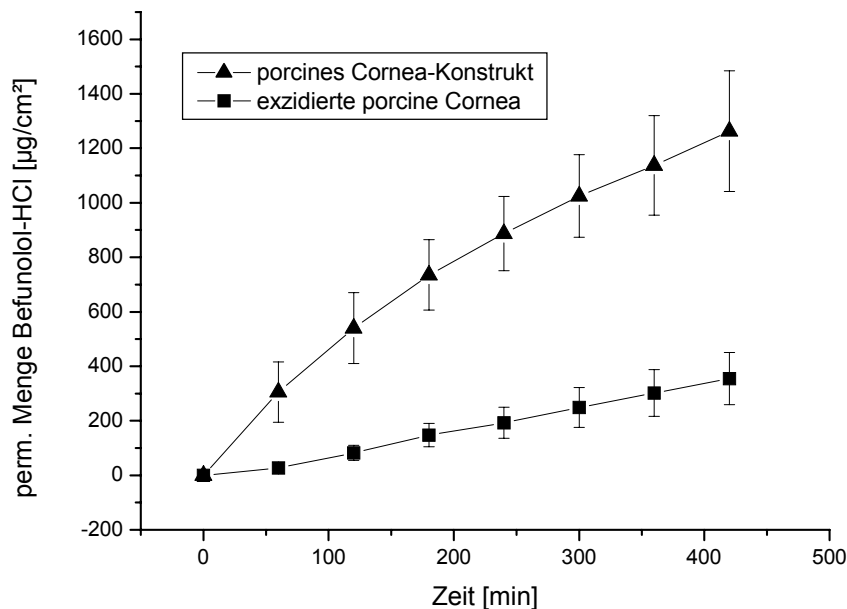


Abbildung 4.40: Permeation von Befunololhydrochlorid aus BHCl-AG 1% Augengel durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=4)

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$4,12 \cdot 10^{-8} \pm 1,23 \cdot 10^{-8}$	$4,08 \cdot 10^{-6} \pm 1,22 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$1,53 \cdot 10^{-8} \pm 0,43 \cdot 10^{-8}$	$1,51 \cdot 10^{-6} \pm 0,43 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.14: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Befunololhydrochlorid aus BHCl-AG 1% Augengel durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=4)

4.4.1.3.3. BHCl-AS 2% Augensalbe

In Anlehnung an die Ergebnisse mit Spersacarpin[®] Augensalbe war für die Permeation mit BHCl-AS 2% Augensalbe ebenfalls eine deutliche Reduktion der Permeationsrate im Vergleich zu den wässrigen Formulierungen Glauconex[®] Augentropfen und BHCl-AG 1% Augengel zu erwarten. Die entsprechende Grafik ist in Abbildung 4.41 dargestellt. Es zeigte

sich erwartungsgemäß die stark verringerte Permeationsrate sowohl beim Konstrukt als auch beim Exzidat.

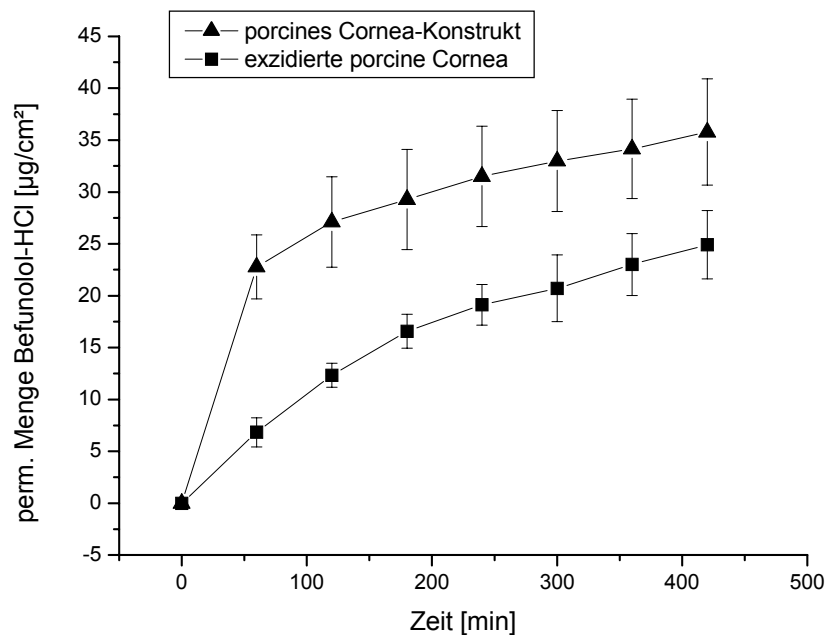


Abbildung 4.41: Permeation von Befunololhydrochlorid aus BHCl-AS 2% Augensalbe durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=8) und die exzidierte porcine Cornea (n=4)

Beim Vergleich der Permeationskoeffizienten in Tabelle 4.15 war zu erkennen, dass das Konstrukt und das Exzidat auch im Fall der befunololhydrochloridhaltigen Augensalbe die gleichen Permeationskoeffizienten und somit die gleichen Permeationsbarrieren aufweisen. Dies wiederum deutet, wie schon bei IML 2% und Spersacarpin[®] Augensalbe vermutet, auf eine geschwindigkeitsbestimmende Freisetzung des Arzneistoffs durch die Zubereitung hin (Abschnitt 4.4.1.1.8.).

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$5,16 \cdot 10^{-10} \pm 0,53 \cdot 10^{-10}$	$2,81 \cdot 10^{-8} \pm 0,29 \cdot 10^{-8}$
exzidierte porcine Cornea	$5,49 \cdot 10^{-10} \pm 1,32 \cdot 10^{-10}$	$2,99 \cdot 10^{-8} \pm 0,72 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 4.15: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Befunololhydrochlorid aus BHCl-AS 2% Augensalbe durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=8) und die exzidierte porcine Cornea (n=4)

4.4.1.3.4. Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen mit befunololhaltigen Formulierungen durch die exzidierte porcine Cornea und das porcine Cornea-Konstrukt

Zur Zusammenfassung der Permeationsuntersuchungen mit Befunololhydrochlorid sind die entsprechenden Permeationsdaten in Tabelle 4.16 gegenübergestellt.

	Permeationskoeffizient P [cm/s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
	porcines Cornea-Konstrukt	exzidierte porcine Cornea
Glaucnex [®] 0,5% AT	$24,8 \cdot 10^{-6} \pm 4,79 \cdot 10^{-6}$	$5,95 \cdot 10^{-6} \pm 0,52 \cdot 10^{-6}$
BHCl-AG 1% Augengel	$4,08 \cdot 10^{-6} \pm 1,22 \cdot 10^{-6}$	$1,51 \cdot 10^{-6} \pm 0,43 \cdot 10^{-6}$
BHCl-AS 2% Augensalbe	$2,81 \cdot 10^{-8} \pm 0,29 \cdot 10^{-8}$	$2,99 \cdot 10^{-8} \pm 0,72 \cdot 10^{-8}$

Tabelle 4.16: Zusammenfassung der Permeationskoeffizienten der untersuchten Systeme für das Cornea-Konstrukt und die exzidierte Cornea, Mittelwert \pm Standardabweichung

In Analogie zu den bisherigen Permeationsuntersuchungen mit PHCl und HC zeigte sich auch für BHCl im Falle der wässrigen Formulierungen eine erhöhte Permeabilität des Cornea-Konstruktes im Vergleich zur exzidierten Cornea. Beim Vergleich der Permeationskoeffizienten ergab sich für Glaucnex[®] 0,5% Augentropfen und BHCl-AG 1% Augengel ein Unterschied von etwa Faktor 3-4. Hingegen konnte bei BHCl-AS 2% Augensalbe sowohl für Konstrukt als auch für Exzidat der gleiche Permeationskoeffizient ermittelt werden, wobei auch beim BHCl die Permeationsrate der Augensalbe für das Exzidat etwa um den Faktor 100 niedriger war als bei den wässrigen Formulierungen.

Diese Ergebnisse deuten an, dass das porcine Cornea-Konstrukt für verschiedene Arzneistoffe mit unterschiedlichen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten in verschiedenen wässrigen Formulierungen und mit unterschiedlichen pH Werten ähnliche Permeabilitäten aufweist wie die exzidierte porcine Cornea, wobei die Permeabilität des Konstruktes gegenüber dem Exzidat etwa um den Faktor 2-4 erhöht ist. Hierbei kann das porcine Cornea-Konstrukt als gute Alternative zu Cornea-Exzidaten bei in vitro Permeationsuntersuchungen angesehen werden.

4.4.2. Humanes Cornea-Konstrukt

Nachdem mit dem porcinen Cornea-Konstrukt durch Permeationsuntersuchungen eine gute Annäherung der Barriereigenschaften des Gewebeäquivalentes an die Verhältnisse der exzidierten porcinen Cornea gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob das humane Cornea-Konstrukt ebenfalls Barriereigenschaften aufweist, um als in vitro Modell eingesetzt werden zu können.

Da gesunde exzidierte humane Hornhäute für vergleichende Untersuchungen aufgrund des Mangels an Spenderhornhäuten nicht zur Verfügung standen, und vergleichbare Daten mit humanen Corneae in der Literatur nicht existieren, wurden erhaltene Permeationsdaten mit den bereits ermittelten Werten für exzidierte Corneae vom Schwein bzw. für porcine Cornea-Konstrukte verglichen. Zur Untersuchung der Barriereigenschaften des humanen Cornea-Konstruktes wurden Permeationsuntersuchungen mit den jeweiligen wässrigen Lösungen von PHCl, HC und BHCl durchgeführt, wobei für PHCl und BHCl die Fertigarzneimittel Borocarpin[®] S bzw. Glauconex[®] verwendet wurden.

4.4.2.1. Permeationsuntersuchungen wässriger Formulierungen durch das humane Cornea-Konstrukt

4.4.2.1.1. Borocarpin[®] S Augentropfen

In Abbildung 4.42 sind die Permeationsgraphen mit Borocarpin[®] S Augentropfen für alle drei Permeationsbarrieren dargestellt. Ganz deutlich wird ersichtlich, dass das humane Konstrukt eine wesentlich stärkere Permeationsbarriere gegenüber PHCl aus Borocarpin[®] S ausbildet als das porcine Konstrukt. Dabei scheint das humane Cornea-Konstrukt etwas permeabler zu sein als das porcine Exzidat.

Die errechneten Permeationskoeffizienten sind in Tabelle 4.17 gegenübergestellt. Das humane Cornea-Konstrukt zeigt gegenüber der exzidierten porcinen Cornea nur geringe Unterschiede, wobei es etwa um den Faktor 1,6 permeabler ist als das Exzidat. Gegenüber dem porcinen Konstrukt weist das humane Konstrukt eine etwa um den Faktor 2,6 stärkere Permeationsbarriere auf. Dies deutet darauf hin, dass die Erhöhung der Anzahl epithelialer Schichten im humanen Konstrukt (Abbildung 4.19) im Vergleich zum porcinen Konstrukt (Abbildung 4.14) auch mit einer Erhöhung der Permeationsbarriereigenschaften einhergeht.

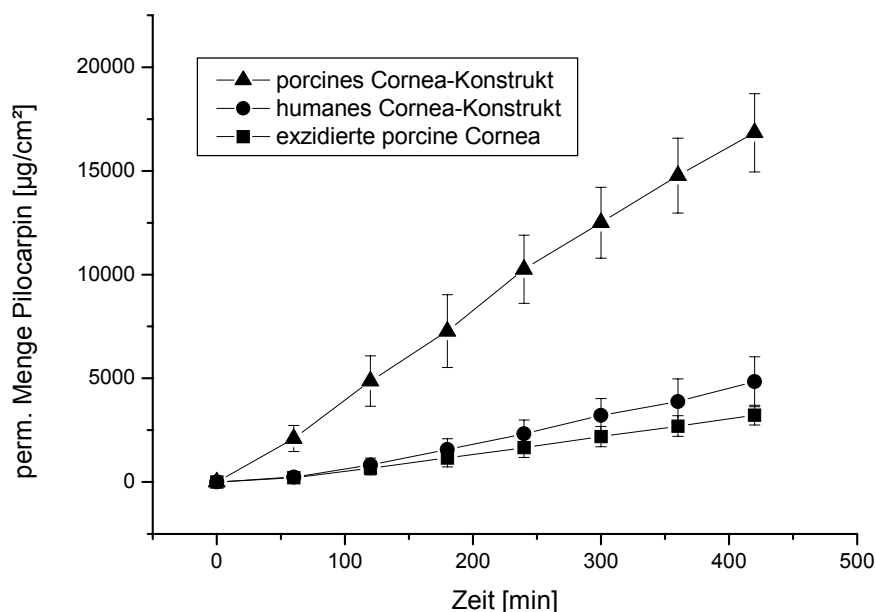


Abbildung 4.42: Permeation von PHCl aus Borocarpin® S 2% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=6), das humane Cornea-Konstrukt (n=11) und die exzidierte porcine Cornea (n=4)

	Flux J [g/cm²·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$7,17 \cdot 10^{-7} \pm 3,08 \cdot 10^{-8}$	$35,6 \cdot 10^{-6} \pm 1,53 \cdot 10^{-6}$
humanes Cornea Konstrukt	$2,70 \cdot 10^{-7} \pm 6,06 \cdot 10^{-8}$	$13,4 \cdot 10^{-6} \pm 3,01 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$1,73 \cdot 10^{-7} \pm 1,07 \cdot 10^{-8}$	$8,57 \cdot 10^{-6} \pm 0,53 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.17: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von PHCl aus Borocarpin® S 2% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=6), das humane Cornea-Konstrukt (n=11) und die exzidierte porcine Cornea (n=4), Mittelwert \pm Standardabweichung

4.4.2.1.2. Hydrocortison Lösung HC 0,02% OK

Um zu untersuchen, ob die Permeation mit lipophilen Stoffen zu ähnlichen Ergebnissen wie mit PHCl führt, wurde die Permeation mit HC 0,02% OK durch das humane Cornea-Konstrukt durchgeführt. Die entsprechende Grafik ist in Abbildung 4.43 zu sehen. Es zeigt sich ein ganz ähnliches Bild wie in Abbildung 4.42. Das humane Konstrukt erscheint für HC

weit weniger permeabel zu sein als das porcine Konstrukt, wobei das porcine Exzidat wiederum die stärkste Permeationsbarriere besitzt.

In Tabelle 4.18 sind die entsprechenden Permeationsdaten quantifiziert. Beim Vergleich zwischen humanem Konstrukt und porcinem Exzidat ergibt sich ein Unterschied der Permeabilität von etwa Faktor 1,8. Somit ergibt sich auch wie schon beim Borocarpin® S nur ein geringer Unterschied zwischen Konstrukt und Exzidat.

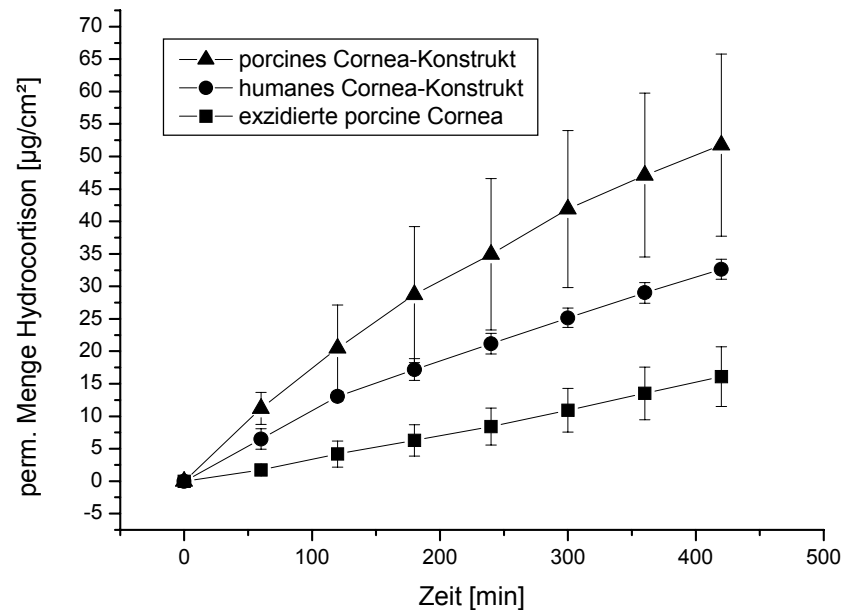


Abbildung 4.43: Permeation von Hydrocortison aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung HC 0,02% OK durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=8), das humane Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=12)

	Flux J [g/cm²·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$1,42 \cdot 10^{-9} \pm 0,24 \cdot 10^{-9}$	$7,11 \cdot 10^{-6} \pm 1,21 \cdot 10^{-6}$
humanes Cornea Konstrukt	$1,08 \cdot 10^{-9} \pm 0,08 \cdot 10^{-9}$	$5,41 \cdot 10^{-6} \pm 0,40 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$0,61 \cdot 10^{-9} \pm 0,20 \cdot 10^{-9}$	$3,07 \cdot 10^{-6} \pm 0,99 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.18: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Hydrocortison aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung HC 0,02% OK durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=8), das humane Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=12), Mittelwert \pm Standardabweichung

Die für das porcine Konstrukt gegenüber dem humanen Konstrukt erhöhte Permeabilität stellt sich mit einem Faktor von etwa 1,3 dar, der somit entschieden geringer ausfällt als bei Borocarpin® S.

4.4.2.1.3. Glauconex® Augentropfen

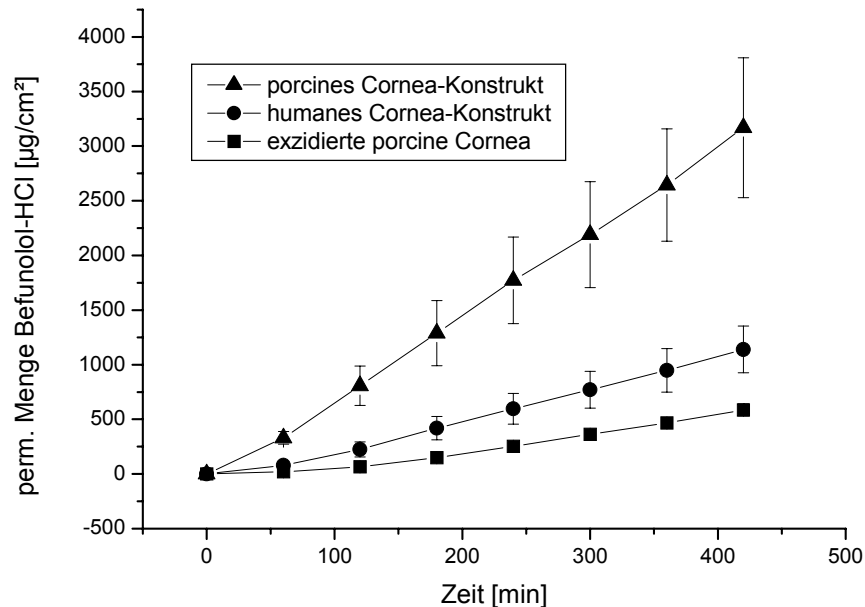


Abbildung 4.44: Permeation von Befunololhydrochlorid aus Glauconex® 0,5% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5), das humane Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=5)

Wie man nach den Permeationsuntersuchungen mit PHCl und HC erwarten konnte, zeigt sich auch für die Permeation mit Befunololhydrochlorid das gleiche Permeationsverhalten. Abbildung 4.44 stellt die Permeationsverläufe für Glauconex® dar. Wieder zeigt das humane Konstrukt ein Permeationsverhalten, dass dem des Exzidates recht ähnlich ist. Des Weiteren bildet das humane Konstrukt für BHCl eine wesentlich stärkere Barriere aus als das porcine Konstrukt.

Tabelle 4.19 ergibt im Vergleich zwischen humanem Konstrukt und porcinem Exzidat eine um den Faktor 1,7 erhöhte Permeabilität, während das porcine Konstrukt etwa um den Faktor 2,5 deutlich stärker permeabel ist als das humane Konstrukt. Diese Werte sind wiederum sehr ähnlich zu den ermittelten Permeationsunterschieden mit Borocarpin® S.

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
porcines Cornea Konstrukt	$1,24 \cdot 10^{-7} \pm 0,24 \cdot 10^{-7}$	$24,8 \cdot 10^{-6} \pm 4,79 \cdot 10^{-6}$
humanes Cornea Konstrukt	$0,49 \cdot 10^{-7} \pm 0,89 \cdot 10^{-8}$	$9,88 \cdot 10^{-6} \pm 1,79 \cdot 10^{-6}$
exzidierte porcine Cornea	$0,30 \cdot 10^{-7} \pm 0,26 \cdot 10^{-8}$	$5,95 \cdot 10^{-6} \pm 0,52 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.19: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Befunololhydrochlorid aus Glauconex[®] 0,5% Augentropfen durch das porcine Cornea-Konstrukt (n=5), das humane Cornea-Konstrukt (n=5) und die exzidierte porcine Cornea (n=5), Mittelwert ± Standardabweichung

4.4.2.1.4. Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen wässriger Formulierungen durch das humane Cornea-Konstrukt

Zusammenfassend sind die Permeationskoeffizienten in Tabelle 4.20 gegenübergestellt. Für alle drei Arzneistoffe stellt das porcine Exzidat die stärkste Permeationsbarriere dar, wobei die Unterschiede zum humanen Cornea-Konstrukt nicht sehr groß sind. Das porcine Konstrukt ist für alle drei Stoffe deutlich permeabler als das humane Konstrukt.

	Permeations- koeffizient P [cm/s]	Permeations- koeffizient P [cm/s]	Permeations- koeffizient P [cm/s]
	porcines Cornea- Konstrukt	humanes Cornea- Konstrukt	exzidierte porcine Cornea
Borocarpin [®] S 2%	$35,6 \cdot 10^{-6} \pm 1,53 \cdot 10^{-6}$	$13,4 \cdot 10^{-6} \pm 3,01 \cdot 10^{-6}$	$8,57 \cdot 10^{-6} \pm 0,53 \cdot 10^{-6}$
HC 0,02% OK	$7,11 \cdot 10^{-6} \pm 1,21 \cdot 10^{-6}$	$5,41 \cdot 10^{-6} \pm 0,40 \cdot 10^{-6}$	$3,07 \cdot 10^{-6} \pm 0,99 \cdot 10^{-6}$
Glauconex [®] 0,5%	$24,8 \cdot 10^{-6} \pm 4,79 \cdot 10^{-6}$	$9,88 \cdot 10^{-6} \pm 1,79 \cdot 10^{-6}$	$5,95 \cdot 10^{-6} \pm 0,52 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.20: Zusammenfassung der Permeationskoeffizienten der untersuchten Systeme für das porcine Cornea-Konstrukt, das humane Cornea-Konstrukt und die exzidierte Cornea, Mittelwert ± Standardabweichung

Bemerkenswert ist, dass die Unterschiede in den Barriereigenschaften zwischen humanem Konstrukt und porcinem Exzidat für die drei verschiedenen Wirkstoffe (PHCl, HC, BHCl), in den verschiedenen wässrigen Lösungen sehr ähnlich sind. Der Faktor zwischen humanem Konstrukt und porcinen Exzidat variiert nur zwischen 1,6-1,8, während beim Vergleich zwischen porcinem Konstrukt und dem porcinen Exzidat für die drei Wirkstoffe der Faktor zwischen 2,3-4,1 variierte. Dies deutet darauf hin, dass das humane Cornea-Konstrukt im Gegensatz zum porcinen Konstrukt für verschiedenste Arzneistoffe den gleichen Unterschieds-Faktor der Permeabilität zum Exzidat zeigt. Ein konstanter Unterschieds-Faktor wäre eine wertvolle Eigenschaft des in vitro Modells, um genaue Vorhersagen über die Permeabilitäten beim Originalgewebe treffen zu können.

Da keine Permeationsdaten mit exzidierter humaner Cornea für die untersuchten Lösungen existieren, ist der direkte Bezug und somit eine Aussage über die tatsächliche Vergleichbarkeit zwischen dem humanen Cornea-Konstrukt und exzidierter humaner Cornea bei in vitro Permeationsuntersuchungen schwer möglich. Die Tatsache, dass das porcine corneale Epithel in vivo etwa um 2-3 Zellschichten reicher ist als das humane corneale Epithel in vivo (Abschnitt 2.2.1), und die Permeabilität bei abnehmender Anzahl epithelialer Schichten sinkt [Prausnitz und Noonan, 1998; Scholz et al., 2002], lässt durchaus den Schluss zu, dass der Faktor zwischen dem humanen Cornea-Konstrukt und exzidierter humaner Cornea noch wesentlich geringer ist, als der oben beschriebene Faktor 1,6-1,8 zwischen humanem Konstrukt und porcinem Exzidat.

Diese Vermutung deutet darauf hin, dass das entwickelte humane Konstrukt in der Lage sein könnte, bei in vitro Permeationsuntersuchungen der exzidierten humanen Hornhaut äquivalente Ergebnisse zu liefern.

Weitere corneale in vitro Modelle für Permeationsuntersuchungen, die auf humanen Zellkulturen basieren, wurden bisher nur von Toropainen et al. (2001) beschrieben. Sie kultivierten ein mehrschichtiges humanes Corneaepithel, ebenfalls ausgehend von transformierten Epithelzellen, auf einem Kollagengel mit kokultivierten Fibroblasten, ohne corneale Endothelzellen. Bei vergleichenden Permeationsuntersuchungen mit exzidierter Kaninchencornea konnten sie für wässrige Lösungen der sehr hydrophilen Verbindung ^3H -Mannitol ($\log P_{\text{oct/wasser}} -2,2$) eine um den Faktor 3,7 und für wässrige Lösungen der sehr lipophilen Substanz Rhodamin B ($\log P_{\text{oct/wasser}} 2,3$) eine um den Faktor 1,2 erhöhte Permeabilität des in vitro Modells zeigen.

4.4.2.2. Permeationsuntersuchungen wässriger Formulierungen durch humane Cornea-Konstrukte unter Berücksichtigung des Einflusses von Endothel und Stroma auf die Barriereigenschaften des Konstruktes

Da Toropainen et al. (2001) zeigen konnten, dass allein die Kokultivierung humaner cornealer Epithelzellen mit Fibroblasten auf einem Kollagengel zu einem mehrschichtigen Epithelgewebe mit adäquaten Barriereigenschaften führt, sollte untersucht werden, welchen Einfluss Endothel und Stroma-Biomatrix auf die Permeabilität des humanen Cornea-Konstruktes haben.

Zu diesem Zweck wurden humane Cornea-Konstrukte ohne Endothelschicht bzw. ohne Endothel und Stroma-Biomatrix kultiviert. Mit diesen verschiedenen kultivierten Konstrukten wurden vergleichende Permeationsuntersuchungen für Borocarpin[®] S und HC 0,02% OK durchgeführt.

4.4.2.2.1. Borocarpin[®] S Augentropfen

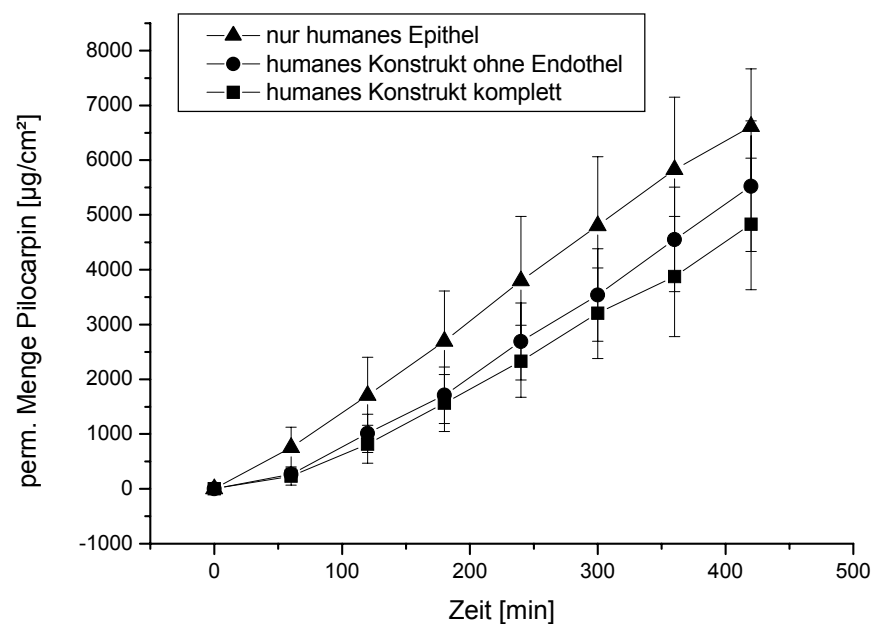


Abbildung 4.45: Permeation von Pilocarpinhydrochlorid aus Borocarpin[®] S 2% Augentropfen durch das kultivierte humane Epithel (n=8), das humane Cornea-Konstrukt ohne Endothel (n=3) und das komplette humane Cornea-Konstrukt (n=11)

Wie in Abbildung 4.45 aus den Permeationsgraphen zu entnehmen ist, sind die Unterschiede im Permeationsverhalten der verschiedenen kultivierten Konstrukte nicht sehr stark ausgeprägt. Doch zeigt sich, wie zu erwarten war, eine Abhängigkeit der Durchgängigkeit der Gewebe von der Kultivierung. Reines Epithel auf einem Kollagengel ist für PHCl in dieser Untersuchung permeabler als das Epithelgewebe, welches auf einer Stroma-Biomatrix kultiviert wurde. Die niedrigste Permeationsrate weist das komplette Konstrukt, das alle cornealen Schichten enthält, auf.

Beim Vergleich der einzelnen Permeationskoeffizienten in Tabelle 4.21 zeigt sich, dass sich die Permeabilitäten vom kompletten Konstrukt und dem Konstrukt ohne Endothel nur um den Faktor 1,07 unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Fall das Endothel nur geringen Einfluss auf die Permeationsbarriere hat. Der Unterschied zwischen Konstrukt ohne Endothel und alleinigem Epithel beträgt Faktor 1,19 und zeigt den Einfluss der Kokultivierung mit Fibroblasten [Toropainen et al., 2001], wenngleich sich auch hier kein signifikanter Unterschied (*t*-Test) zeigte. Bei der Prüfung auf signifikante Unterschiede der Permeationskoeffizienten (*t*-Test) zwischen dem kompletten Konstrukt und dem alleinigen Epithel ergibt sich sehr wohl ein signifikanter Unterschied, von Faktor 1,27.

Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Kultivierung des Konstruktes mit Stroma-Biomatrix zu einer Verringerung der Permeabilität der *in vitro* Cornea führt, wobei sich dieser Effekt durch Einfügen der endothelialen Schicht noch steigern lässt.

	Flux J [g/cm ² ·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
nur Epithel	$3,42 \cdot 10^{-7} \pm 6,46 \cdot 10^{-8}$	$17,0 \cdot 10^{-6} \pm 3,21 \cdot 10^{-6}$
Konstrukt ohne Endothel	$2,88 \cdot 10^{-7} \pm 4,65 \cdot 10^{-8}$	$14,3 \cdot 10^{-6} \pm 2,31 \cdot 10^{-6}$
Cornea-Konstrukt komplett	$2,70 \cdot 10^{-7} \pm 6,06 \cdot 10^{-8}$	$13,4 \cdot 10^{-6} \pm 3,01 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.21: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Pilocarpinhydrochlorid aus Borocarpin[®] S 2% Augentropfen durch das kultivierte humane Epithel (n=8), das humane Cornea-Konstrukt ohne Endothel (n=3) und das komplette humane Cornea-Konstrukt (n=11), Mittelwert ± Standardabweichung

4.4.2.2.2. Hydrocortison Lösung HC 0,02% OK

Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich beim Vergleich der Permeationsuntersuchungen mit Hydrocortison in Abbildung 4.46. Wiederum zeigen sich nur geringe Unterschiede im Permeationsverlauf, wobei auch hier Unterschiede beim Vergleich der errechneten Permeationskoeffizienten zu detektieren sind (Tabelle 4.21).

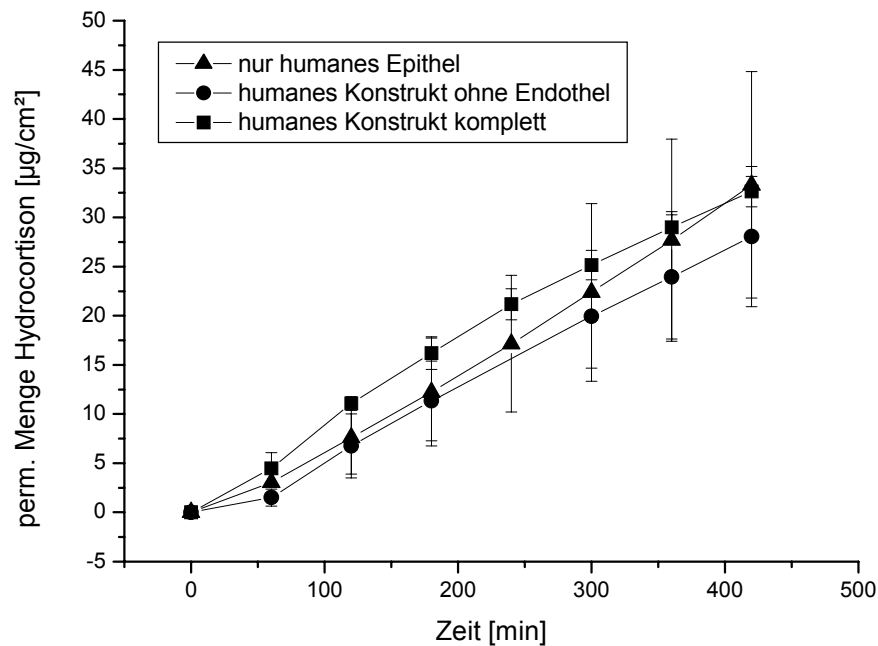


Abbildung 4.46: Permeation von Hydrocortison aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung HC 0,02% OK durch das kultivierte humane Epithel (n=11), das humane Cornea-Konstrukt ohne Endothel (n=4) und das komplette humane Cornea-Konstrukt (n=5)

	Flux J [g/cm²·s]	Permeationskoeffizient P [cm/s]
nur Epithel	$1,57 \cdot 10^{-7} \pm 0,38 \cdot 10^{-9}$	$7,85 \cdot 10^{-6} \pm 1,92 \cdot 10^{-6}$
Konstrukt ohne Endothel	$1,19 \cdot 10^{-9} \pm 0,24 \cdot 10^{-9}$	$5,96 \cdot 10^{-6} \pm 1,21 \cdot 10^{-6}$
Cornea-Konstrukt komplett	$1,08 \cdot 10^{-9} \pm 0,08 \cdot 10^{-9}$	$5,41 \cdot 10^{-6} \pm 0,40 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 4.21: Arzneistoffflux und Permeationskoeffizient für die Permeation von Hydrocortison aus der konservierungsmittelfreien wässrigen Lösung HC 0,02% OK durch das kultivierte humane Epithel (n=11), das humane Cornea-Konstrukt ohne Endothel (n=4) und das komplette humane Cornea-Konstrukt (n=5), Mittelwert \pm Standardabweichung

Für das Konstrukt ohne Endothel zeigt sich gegenüber dem kompletten Konstrukt eine um den Faktor 1,10 erhöhte Durchlässigkeit für Hydrocortison. Vergleicht man das Konstrukt ohne Endothel mit dem alleinigen Epithel, so lässt sich eine um den Faktor 1,31 erhöhte Permeabilität feststellen. Ein signifikanter Unterschied (t -Test) ist nur beim Vergleich der Permeationskoeffizienten von dem kompletten Konstrukt und dem alleinigen Epithel festzustellen, wobei sich dieser Unterschied durch Faktor 1,45 quantifizieren lässt.

Auch für den lipophilen Arzneistoff Hydrocortison erscheint die Kultivierung eines kompletten Konstruktes zur Erhöhung der Permeationsbarriereigenschaften sinnvoll, wenngleich die Unterschiede zum Konstrukt ohne Endothel nicht sehr groß sind.

4.4.2.2.3. Zusammenfassende Diskussion zu den Permeationsuntersuchungen wässriger Formulierungen durch humane Cornea-Konstrukte unter Berücksichtigung des Einflusses von Endothel und Stroma auf die Barriereigenschaften des Konstruktes

Dass bei der Kultivierung von cornealem Epithelgewebe in vitro die Ausprägung einer entsprechenden Morphologie [Zieske et al., 1994] bzw. die Erhöhung der Permeationsbarriereigenschaften [Tegtmeyer, 2000] von der Kokultivierung mit anderen cornealen Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen) abhängt, ist seit Längerem bekannt.

Die oben gezeigten Permeationsuntersuchungen mit Borocarpin[®] S und HC 0,02% OK zeigen, dass die Unterschiede im Permeationsverhalten nicht sehr stark ausgeprägt sind, jedoch für das humane Cornea-Konstrukt, das alle Zellen enthält, eine signifikante Steigerung der Barriereigenschaften gegenüber dem reinen Epithel ermittelt werden konnte.

Zur Annäherung des Cornea-Konstruktes, als in vitro Modell für Permeationsuntersuchungen, an die Barriereverhältnisse der exzidierten Cornea erscheint es daher sinnvoll, das Konstrukt mit allen drei cornealen Zelltypen zu kultivieren.

5 Abschlussdiskussion

5.1. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der porcinen cornealen Zellen

Der angestrebten Entwicklung eines cornealen Gewebeäquivalentes muss eine selektive Isolierung homogener Primärkulturen der drei verschiedenen Zelltypen der Cornea (Epithel-, Stroma- und Endothelzellen) vorangehen. Die Etablierung reiner Zellkulturen der Cornea war über die Kombination von Explantattechniken [Stocker et al., 1958] und enzymatischer Behandlung des cornealen Gewebes [Gipson und Grill, 1982; McCallum et al., 1982] möglich. Die Gewinnung der Endothelzellen sowie der Fibroblasten erwies sich in diesem Fall als unproblematisch, wohingegen die Isolierung der Epithelzellen mithilfe der Explantattechnik [Fowle und Ormsby, 1955] erfolglos blieb und erst durch die Verwendung von Dispase II als gewebedissoziierendem Enzym und durch den Einsatz kollagenbeschichteter Substrate möglich wurde.

Somit war die Isolierung homogener Kulturen, unter Vermeidung von Mischkultivierung, aus den Hornhäuten eines Schlachttieres möglich.

Der Zusammensetzung des Wachstumsmediums kommt bei der Kultivierung von Zellen eine ganz entscheidende Bedeutung zu [Freshney, 1990], was sich in einer entsprechenden Wachstumsrate und der Ausbildung spezifischer Merkmale bemerkbar macht. Somit war zu untersuchen, ob die Verwendung von DMEM unter Zusatz von 10% Kälberserum [Zieske et al., 1994; Tegtmeyer et al., 2001] zu stabilen Kulturen aller drei Zelltypen der porcinen Cornea führt und eine ausreichende Zellvermehrung für nachfolgende Untersuchungen zulässt. Es ergab sich, dass alle drei cornealen Zelltypen unter den vorgegebenen Kultivierungsbedingungen mindestens über 6 Passagen unter Beibehaltung ihrer typischen Morphologie und des Wachstumsverhaltens kultiviert werden konnten. Bei den entsprechenden Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der Zellen bei Kultivierung mit diesem Standardmedium zeigte sich ein zufriedenstellendes Ergebnis, wobei alle drei Zellarten ein ähnliches exponentielles Wachstum bis zur Konfluenz in den Zellkulturgefäßen zeigten.

Darüber hinaus konnte bei Untersuchungen zur Anheftungseffizienz der Zellen nach Kryokonservierung gezeigt werden, dass das eingesetzte Gefriermedium unter Verwendung von DMSO als Kryoprotektivum zur Langzeitkonservierung der porcinen Corneazellen geeignet ist. Diese Konservierung der Zellen ist nötig, um im Hinblick auf die spätere

Kultivierung eines standardisierten in vitro Modells der Cornea auf Zellmaterial mit gleichen Eigenschaften zurückgreifen zu können.

Zur Beschreibung und Charakterisierung der cornealen Zellkulturen bedient man sich zum einen der typischen Morphologie der Zellen in Kultur. Zum anderen ist eine Charakterisierung der Reinheit von Kulturen über den immunologischen Nachweis typischer Zellmerkmale (z.B. Intermediärfilamente) möglich [Alberts, 1995].

Alle drei Zelltypen der porcinen Cornea konnten im Lichtmikroskop bei Standardkultivierung über ihr morphologisches Erscheinungsbild identifiziert werden, wobei sehr deutliche Unterschiede zwischen den spindelförmigen, langgestreckten Fibroblasten und den eher polygonalen Endothel- und Epithelzellen zu erkennen sind. Sicherheit bei der Unterscheidung von Endothelzellen und Epithelzellen gaben immunocytochemische Untersuchungen, wobei sich bei den Epithelzellen die Expression von Cytokeratinen als charakteristischen Intermediärfilamenten [Sun und Vidrich, 1981] und bei den Endothelzellen sowie den Fibroblasten das Auftreten von Vimentin [Hayashi et al., 1986] nachweisen ließ.

5.2. Aufbau und Charakterisierung des porcinen organotypischen Cornea-Konstruktes

Die Tatsache, dass bereits zahlreiche dreidimensionale Zellkulturmodelle [Lehr, 2002] verschiedenster Gewebeherkunft, z.B. Hautäquivalente [Specht et al., 1998] oder Kulturen von alveolarem Gewebe [Elbert, 1998], etabliert sind, gab Grund zur Annahme, dass ausgehend von porcinen Corneazellen durch schrittweise Rekonstruktion die Entwicklung eines organotypischen Gewebeäquivalentes möglich ist, das histologisch dem Originalgewebe ähnelt. Diese Übereinstimmung verschiedener corneatypischer histologischer Merkmale, so die Vorstellung, könnte ebenfalls mit der Ausbildung von Permeationsbarriereeigenschaften im Cornea-Konstrukt einhergehen, und somit das Cornea-Konstrukt als in vitro Modell für Permeationsuntersuchungen sinnvoll erscheinen lassen.

Aufbauend auf Untersuchungen zum Tissue engineering von cornealem Gewebe [Minami et al., 1993; Germain et al., 2000; Tegtmeier et al., 2001] wurde ein Cornea-Konstrukt, das aus allen drei Corneazelltypen und einer Kollagenbiomatrix bestand, in speziellen Transwell®-Membraneinsätzen kultiviert. Diese ermöglichen sowohl eine submerse Kultivierung als auch eine Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze, die zur Ausbildung eines entsprechenden mehrschichtigen Epithels führt. Auf eine konfluente Schicht endothelialer Zellen wurde ein Gel, bestehend aus Kollagen Typ I mit inkorporierten stromalen Zellen, aufgebracht, das sich nach weiterer Kultivierung in Abhängigkeit von Zellzahl und Kollagenkonzentration aufgrund

der vitalen Fibroblasten kontrahierte [Bell et al., 1979]. Eine solche Biomatrix in Kombination mit stromalen und endothelialen Zellen bei der Kokultivierung mit cornealen epithelialen Zellen gilt als eine wichtige Voraussetzung für die spätere Ausdifferenzierung des Epithels [Zieske et al., 1994]. Nach Erreichen einer konfluenten Schicht an Epithelzellen auf der Stroma-Biomatrix und anschließender Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze kam es zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels, wobei diese besondere Art der Kultivierung einen großen Einfluss auf die Histologie und die Ausdifferenzierung des cornealen Epithels besitzt [Chang et al., 2000].

Nach Anfertigung histologischer Schnittpreparate konnte eine gute Überstimmung von Gewebemerkmale zwischen dem Cornea-Konstrukt und der porcinen in vivo Cornea festgestellt werden. Es zeigte sich, dass die schrittweise Rekonstruktion zu einem äquivalenten Erscheinungsbild der einzelnen Schichten führt, wobei im Cornea-Konstrukt die Ausbildung von Endothel-, Stroma- und Epithelgewebe gezeigt werden konnte. Darüber hinaus kam es zur Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels, was darauf hindeutet, dass das Konstrukt ebenfalls Permeationsbarriereeigenschaften aufweisen könnte, da das mehrschichtige Epithel zum größten Teil die Barriereeigenschaften der Cornea bestimmt [Prausnitz und Noonan, 1998].

Zur weiteren Charakterisierung organotypischer Strukturen der in vitro Cornea dienten immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis der Basalmembrankomponenten Laminin und Fibronectin, elektrophoretische Bestimmungen bzw. Western-Blot Untersuchungen zum exprimierten Keratinmuster des Epithels im Cornea-Konstrukt sowie REM-Untersuchungen zur Ultrastruktur von Oberflächen des Cornea-Konstruktes. Dass es, bedingt durch die besonderen Kultivierungsbedingungen und die Kokultivierung der Zellen, zur Ausbildung basalmembranähnlicher Strukturen im porcinen Cornea-Konstrukt kommt, ließ sich durch den Nachweis von Laminin und Fibronectin zwischen Epithel bzw. Endothel und der Stroma-Biomatrix zeigen. Dies deutet auf entsprechende Interaktionen der Zellen mit dem angebotenen kollagenhaltigen Substrat unter Expression phänotypischer Merkmale hin. SDS-PAGE und Western-Blot Untersuchungen zeigten das Vorkommen eines 64 kDa Keratins (Keratin K3) im Epithelgewebe des Cornea-Konstruktes. Die Anwesenheit von Keratin K3 als Differenzierungsmarker von cornealem Epithelgewebe kann als Beleg für eine Ausdifferenzierung der epithelialen Schichten im Cornea-Konstrukt gewertet werden, wobei die weitere Detektion von 40, 50, 58 kDa Keratinen auf einen Umwandlungsprozess von proliferierenden zu vollständig ausdifferenzierten Epithelzellen im Konstrukt hindeutet [Schermer et al., 1986].

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Oberflächenstrukturen des Endothels im Konstrukt ergaben, dass es bei der Kultivierung des Konstruktes zur Ausbildung eines dicht gewachsenen Endothels kommt, wobei die hexagonale Struktur der Zellen verloren geht. Das Epithel in vitro präsentiert sich ebenfalls als dicht verzahntes Gewebe, während die oberflächlichen Zellen, wahrscheinlich aufgrund der Abwesenheit des präcornealen Tränenfilms und der fehlenden Desquamation, nicht so scharf begrenzt und abgeflacht erscheinen sowie weniger Microvilli aufweisen als das corneale Epithel in vivo.

5.3. Aufbau des humanen Cornea-Konstruktes

Ausgehend von den Ergebnissen bezüglich des Aufbaus eines porcinen Konstruktes konnte ein humanes Konstrukt entwickelt werden, wobei hier transformierte Epithel- und Endothelzelllinien [Offord et al., 1999; Bednarz et al., 2000] sowie selbst isolierte native Fibroblasten verwendet wurden. Die Zellen zeigten sehr gute Wachstumseigenschaften in Kultur unter Verwendung von DMEM, Ham's F12 und Medium 199 als Nährmedien bei Zusatz von 5-10% Kälberserum und ließen sich problemlos kryokonservieren.

Die Kultivierung des humanen Konstruktes konnte äquivalent zu der entwickelten Methode für das porcine Konstrukt erfolgen, wobei sich verkürzte Kultivierungszeiten aufgrund der erhöhten Wachstumsrate der transformierten Zellen ergaben. Der Aufbau eines kompletten humanen Konstruktes wurde bisher einzig von Griffith et al. (1999) gezeigt, wobei sie bei der Kultivierung des humanen Corneaäquivalentes für alle drei Zelltypen transformierte Zelllinien einsetzten.

Histologische Untersuchungen von Querschnittspräparaten zur Charakterisierung des humanen Cornea-Konstruktes zeigten deutliche Übereinstimmungen zwischen humanem Konstrukt und exzidiertem porciner Cornea. Bemerkenswert war die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels, das bezüglich Dicke und Anzahl der epithelialen Schichten der porcinen Cornea in vivo stark ähnelte, wenngleich die klare Strukturierung des Epithels etwas verloren geht. Ultrastrukturelle Untersuchungen im REM ergaben für das humane Cornea-Konstrukt bezüglich der endothelialen Schicht eine sehr starke Annäherung an die in vivo Verhältnisse. Es zeigte sich ein mosaikartiges Muster miteinander verzahnter hexagonaler Zellen. Das Epithelgewebe zeigte Ähnlichkeiten zum porcinen Konstrukt, wobei im Falle des humanen Konstruktes mehr Microvilli und Microplicae detektierbar waren. Die histologischen Ähnlichkeiten zur exzidierten porcinen Cornea lassen die Vermutung zu, dass

es mit der Ausbildung des mehrschichtigen Epithels im humanen Konstrukt ebenfalls zur Ausprägung adäquater Barriereigenschaften kommt.

5.4. Vergleichende Permeationsuntersuchungen mit exzidierter porciner Cornea und den Cornea-Konstrukten

Unter Verwendung dreier Arzneistoffe (Pilocarpinhydrochlorid, Hydrocortison, Befunololhydrochlorid) mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften und in verschiedenen Formulierungen wurden Permeationsuntersuchungen mit den Cornea-Konstrukten durchgeführt. Erhaltene Permeationsdaten wurden mit jenen, die durch Permeationsuntersuchungen mit exzidierter porciner Cornea erzielt wurden, verglichen und zur Beurteilung der Permeabilität bzw. der Eignung der Konstrukte als in vitro Modelle herangezogen. Neben der Beeinflussung der Permeationsrate durch die Formulierung wurde ebenso der Einfluss des Konservierungsmittels BAC und der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze sowie im Falle des humanen Konstruktes die Abhängigkeit des Permeationsergebnisses von den verschiedenen cornealen Schichten untersucht.

5.4.1. Porcines Cornea-Konstrukt

Bei Verwendung der wässrigen Zubereitungen (Augentropfen, Augengele) von PHCl, HC, BHCl ließ sich bei allen drei Arzneistoffen eine erhöhte Permeabilität des Konstruktes im Vergleich zum Exzidat feststellen. Dabei zeigte sich für die drei Arzneistoffe eine um den Faktor 2-4 erhöhte Durchlässigkeit des Konstruktes. Dieser Befund ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass im Konstrukt weniger epitheliale Schichten ausgeprägt werden als im Exzidat, was zu einer Verminderung der Permeationsbarriere führt [Scholz et al., 2002]. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass die Differenzierung des cornealen Gewebes, was z.B. auch auf die für die Dichtigkeit des Epithels mitverantwortlichen Zellverbindungen (tight junctions) zutreffen könnte, bei der in vitro Kultivierung nicht exakt genauso abläuft wie in vivo. Diese Hypothese wird von den gezeigten Ergebnissen der SDS-PAGE zur Expression des Keratinmusters und den REM-Aufnahmen unterstützt.

Eine erhöhte Permeabilität des Cornea-Konstruktes für Arzneistoffe aus wässrigen Zubereitungen ist auch insofern nicht verwunderlich, als für bereits entwickelte corneale Zellkulturmodelle eine erhöhte Permeabilität für wässrige Lösungen beschrieben wurde [Kawazu et al., 1998; Goskonda et al., 2000; Tegtmeyer et al., 2001].

Vergleicht man die Permeabilität der verschiedenen Arzneistoffe durch das Konstrukt und das Exzidat hinsichtlich der Lipophilie, so lässt sich feststellen, dass der Unterschied zwischen Konstrukt und Exzidat für das lipophile HC mit dem Faktor 2,3 etwas kleiner ist als für das hydrophile PHCl und BHCl jeweils mit dem Faktor 4,1. Ein solches Ergebnis lässt eine erhöhte Anzahl interzellulärer Lücken beim Konstrukt im Vergleich zum Exzidat vermuten [Toropainen et al., 2001].

Die Permeation der Arzneistoffe aus den lipophilen Grundlagen zeigte beim Vergleich der Permeabilität eine deutliche Verringerung der Unterschiede zwischen Konstrukt und Exzidat. Während für die ölige Lösung Pilocarpol[®] nur noch ein Unterschied von Faktor 1,3 zu finden war, konnten für die invers mizellare Lösung IML 2% sowie für die beiden W/O-Emulsionssysteme Spersacarpin[®] und BHCl-AS 2% sowohl für Konstrukt als auch Exzidat gleiche Permeationskoeffizienten festgestellt werden. Darüber hinaus war die Permeationsrate der Arzneistoffe aus diesen Systemen im Vergleich zu den wässrigen Formulierungen sehr stark reduziert. Die gleichen Permeationskoeffizienten für diese Systeme, unter Berücksichtigung der erhöhten Permeabilität der Konstrukte bei wässrigen Zubereitungen, führen zu der Annahme, dass in diesen Fällen die Diffusion aus der Zubereitung langsamer verläuft als die Permeation durch die Gewebe und so die Freigabe aus der Zubereitung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Permeation wird.

Die Betrachtung aller durchgeführten Permeationsversuche mit PHCl, HC und BHCl als Arzneistoffen in den verschiedenen Formulierungen durch das porcine Cornea-Konstrukt und die exzidierte porcine Cornea belegt zwar um den Faktor 2-4 erhöhte Permeationsraten für das Konstrukt, jedoch bleibt die Reihenfolge, mit der die Arzneistoffe aus den unterschiedlichen untersuchten Zubereitungen die beiden Gewebe permeieren, stets die gleiche.

Durch Permeationsuntersuchungen mit einer konservierungsmittelfreien pilocarpinhaltigen wässrigen Lösung PHCl 2% OK im Vergleich zur BAC-haltigen Lösung Borocarpin[®] S ließ sich weiterhin zeigen, dass das weit verbreitete Konservierungsmittel Benzalkoniumchlorid einen leichten permeationsfördernden Effekt besitzt, der beim Konstrukt geringfügig stärker ausgeprägt ist als beim Exzidat, so dass sich im Falle von PHCl 2% OK beim Vergleich der Permeationskoeffizienten von Konstrukt und Exzidat ein Unterschied von Faktor 3,5 zeigte, während der Unterschied bei der BAC-haltigen Lösung Borocarpin[®] S Faktor 4,1 betrug. Diese Ergebnisse deuten einen Vorteil des Cornea-Konstruktes gegenüber reinen epithelialen Cornea-Zellkulturmodellen an, für die eine deutlich höhere Beeinflussung der Permeationsrate bei Einsatz von BAC als Konservierungsmittel beschrieben wurde [Goskonda et al., 2000].

Durch vergleichende Permeationsuntersuchungen mit PHCl 2% OK ließ sich weiterhin zeigen, dass die Kultivierung des Cornea-Konstruktes an der Luft-Medium-Grenze zu einer deutlichen Steigerung der Permeationsbarriereigenschaften führt. Es konnte eine um den Faktor 2 verringerte Permeabilität dieses Konstruktes zu einem submers kultivierten Konstrukt ermittelt werden. Dies macht die Bedeutung dieser besonderen Art der Zellkultivierung, die den Verhältnissen *in vivo* nachempfunden ist, deutlich. Ähnliche Ergebnisse beschreiben Chang et al. (2000) und Toropainen et al (2001) bei ihren Untersuchungen mit Epithel-Zellkulturen als *in vitro* Permeationsmodelle.

Die Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen zum Einfluss verschiedener Arzneistoffe, verschiedener Zubereitungen und von BAC als häufig genutztem Konservierungsmittel in Ophthalmika deuten an, dass Daten aus Permeationsuntersuchungen mit dem porcinen Konstrukt als alternatives *in vitro* Modell Vorhersagen über das Permeationsverhalten von Arzneistoffen für die exzidierte porcine Cornea erlauben.

5.4.2. Humanes Cornea-Konstrukt

Um zu untersuchen, inwieweit durch die Ausprägung eines mehrschichtigen Epithels im humanen Cornea-Konstrukt auch eine Permeationsbarriere ausgebildet wird, wurden Permeationsversuche mit den wässrigen Lösungen von PHCl, HC und BHCl durchgeführt, und die Permeationsdaten mit jenen der exzidierten Cornea und des porcinen Konstruktes verglichen. Es konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Zum einen wies das humane Konstrukt eine deutlich stärkere Permeationsbarriere auf als das porcine Konstrukt. Zum anderen waren die Unterschiede zur exzidierten porcinen Cornea mit Faktor 1,6-1,8 ziemlich gering. Bemerkenswert bei den Untersuchungen erscheint weiterhin die Tatsache, dass der Unterschied zwischen humanem Konstrukt und porcinen Exzidat unabhängig vom Arzneistoff und dessen Eigenschaften einen konstanten Wert von 1,6-1,8 aufweist. Ein solcher Umstand eines konstanten Unterschieds-Faktors würde genauere Vorhersagen über das Permeationsverhalten beim Exzidat ermöglichen.

Weitere Beachtung sollte die Tatsache finden, dass die porcine Cornea *in vivo* 2-3 epitheliale Schichten mehr besitzt als die humane Hornhaut, weshalb von einer stärkeren Permeabilität der humanen gegenüber der porcinen Cornea ausgegangen werden kann, so dass die Unterschiede zwischen dem humanen Konstrukt und exzidierter humaner Cornea wahrscheinlich noch geringer sind als die ermittelten Werte für das porcine Exzidat.

Abschließend war zu klären, ob und in welchem Umfang die einzelnen kultivierten Schichten (Endothel, Stroma-Biomatrix) Einfluss auf die Barriereigenschaften des kultivierten humanen Epithels besitzen. Bei Permeationsuntersuchungen mit wässrigen Lösungen von PHCl und HC konnte festgestellt werden, dass die Unterschiede zwischen reinem Epithelgewebe und einem kompletten Konstrukt zwar nicht sehr groß sind, jedoch das komplett kultivierte Konstrukt eine signifikant stärkere Permeationsbarriere ausbildet als das Epithel allein. Zwischen dem kompletten Konstrukt und einem Konstrukt, bei dem auf die Kultivierung des Endothels verzichtet wurde, zeigte sich für die beiden Arzneistoffe kein signifikanter Unterschied, wobei die Permeationsbarriere für das komplette Konstrukt tendenziell stärker ausgeprägt war. Der Einfluss von kokultivierten cornealen Zellen auf die Barriere des kultivierten Corneaepithels scheint bei transformierten humanen Epithelzellen nicht so stark ausgeprägt zu sein, wie dies bei Konstrukten aus nativen Zellen der Fall ist. Tegtmeyer (2000) konnte bei der Kultivierung eines bovinen Cornea-Konstruktes aus nativen Zellen eine Verdopplung der Permeabilität des Konstruktes beobachten, wenn auf die Kokultivierung der endothelialen Schicht verzichtet wurde. Im Gegensatz dazu konnten Toropainen et al. (2001) bei ihren Untersuchungen mit transformierten humanen cornealen Epithelzellen keine signifikante Steigerung der Permeationsbarriere des Epithels bei Kokultivierung mit humanen Fibroblasten feststellen. Die erzielten Ergebnisse deuten an, dass die Kultivierung des humanen Cornea-Konstruktes unter Einbeziehung aller cornealer Zelltypen die stärkste Annäherung an die Eigenschaften des Exzidates bezüglich der Permeationsbarriere liefert, so dass zur Erzielung optimierter Ergebnisse, in Hinblick auf den Einsatz als in vitro Modell, diese Art der Kultivierung zu empfehlen ist.

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die entwickelten porcinen und humanen organotypischen Cornea-Konstrukte geeignet erscheinen, als in vitro Modelle zur Vorhersage der transcornealen Permeation von Arzneistoffen aus Zubereitungen zur Anwendung am Auge eingesetzt zu werden. Weiterhin geben die Ergebnisse Anlass zur Hoffnung, mit dem humanen Konstrukt, realitätsnahe Aussagen über das in vitro Permeationsverhalten von Stoffen am menschlichen Auge treffen zu können.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein porcines dreidimensionales organotypisches Cornea-Konstrukt zu entwickeln und dessen Permeationseigenschaften, in Hinblick auf eine Verwendung als in vitro Modell, zu testen. Ein solches Modell wäre als Alternative zu etablierten in vitro Permeationsversuchen mit exzidierten Hornhäuten von Versuchs- und Schlachttieren zu sehen. Darüber hinaus sollte ein humanes Cornea-Konstrukt entwickelt werden, welches transcorneale in vitro Permeationsdaten liefert, die Aussagen über das in vitro Permeationsverhalten von Stoffen bei der humanen Cornea zulassen.

Dem Aufbau des Konstruktes musste die Kultivierung der Zellen vorangehen, so dass der erste Teil der Arbeit die Isolierung und Standardkultivierung, einschließlich Untersuchungen zur Kryokonservierung und des Wachstumsverhaltens in Kultur, der drei verschiedenen Zelltypen (Endothel-, Stroma- und Epithelzellen) der porcinen Cornea beschreibt. Darüber hinaus konnte über die Morphologie der Zellen sowie über immunocytochemische Nachweise der Intermediärfilamente die Reinheit der verschiedenen Zelltypen in Kultur gezeigt werden.

Im Weiteren konnte durch schrittweise Rekonstruktion der einzelnen Schichten der Cornea in Transwell®-Membraneinsätzen ein dreidimensionales Gewebeäquivalent aufgebaut werden. Dieses Konstrukt zeigte starke histologische Gemeinsamkeiten mit dem exzidierten Gewebe, wobei von besonderem Interesse die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithelgewebes war, was durch die Kultivierung des Konstruktes an der Luft-Medium-Grenze erreicht wurde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass weitere spezifische Parameter während der Kultivierung exprimiert werden. So ließen sich durch immunhistochemische Untersuchungen basalmembranähnliche Strukturen durch den Nachweis von Laminin und Fibronectin im Konstrukt zeigen. Des Weiteren belegten SDS-PAGE und Western-Blot-Untersuchungen das Vorkommen des 64 kDa Keratin K3 im Epithel des Cornea-Konstruktes, welches als Marker für die Ausdifferenzierung des cornealen Epithels gilt. Weiterhin wurden 40, 50, 58 kDa Keratine gefunden, die auf einen Umwandlungsprozess des cornealen Epithels im Konstrukt von proliferierendem zu ausdifferenziertem Gewebe hindeuten. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen konnten weiterhin Ähnlichkeiten in der Oberflächenstruktur des Epithels und des Endothels zwischen Konstrukt und Exzidat aufzeigen. Der Nachweis dieser charakteristischen cornealen Gewebemerkmale, allen voran das mehrschichtige Epithel, führte zur Annahme, das dieses Konstrukt ebenfalls Permeationsbarriereeigenschaften aufweist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein solches Cornea-Konstrukt auch aus humanen Zellen aufgebaut werden kann, wobei neben nativen humanen Fibroblasten transformierte humane Zelllinien des Epithels und Endothels eingesetzt wurden. Bei der histologischen Betrachtung sowie den REM-Untersuchungen ließ sich eine weitere Annäherung dieses humanen Konstrukts an die Eigenschaften der Cornea in vivo feststellen, so dass auch hier mit der Ausbildung einer Permeationsbarriere gerechnet werden konnte.

Zur Bestimmung der Barriereigenschaften der Konstrukte wurden Permeationsuntersuchungen mit drei verschiedenen Arzneistoffen (Pilocarpinhydrochlorid, Hydrocortison, Befunololhydrochlorid) in verschiedenen Zubereitungen durchgeführt und mit Permeationsdaten der exzidierten porcinen Cornea verglichen. Für das porcine Cornea-Konstrukt konnte eine um den Faktor 2-4 erhöhte Permeabilität des Konstruktes für wässrige Zubereitungen der drei Arzneistoffe detektiert werden, wohingegen bei Formulierungen, mit denen eine stark verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs beabsichtigt wird, gleiche Permeabilitäten von Exzidat und Konstrukt ermittelt wurden, so dass bei diesen Systemen von einer verlangsamten Freigabe des Wirkstoffs aus der Zubereitung im Vergleich zur Permeation durch das corneale Gewebe ausgegangen werden muss. Der Zusatz von Benzalkoniumchlorid in einer PHCl-haltigen Formulierung führte sowohl beim Konstrukt als auch beim Exzidat nur zu einer leichten Erhöhung der Permeabilität des Gewebes. Anhand von Permeationsdaten konnte die Bedeutung der Kultivierung des Konstruktes an der Luft-Medium-Grenze auf die Ausprägung von Barriereigenschaften gezeigt werden.

Bei Permeationsuntersuchungen mit dem humanen Cornea-Konstrukt ließ sich eine deutliche Reduktion der Permeabilität gegenüber dem porcinen Konstrukt feststellen. Für wässrige Lösungen der drei Arzneistoffe konnte eine nur noch um den Faktor 1,6-1,8 und damit geringfügig höhere Permeabilität des humanen Konstruktes gegenüber dem porcinen Exzidat ermittelt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass eventuelle Unterschiede zu einem humanen Exzidat noch geringer ausfallen würden. Darüber hinaus ließ sich in Permeationsuntersuchungen feststellen, dass durch die Kultivierung eines Konstruktes, das alle cornealen Schichten enthält, eine stärkere Permeationsbarriere erzielt werden kann als die alleinige Kultivierung von humanem Epithelgewebe.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Möglichkeiten des Einsatzes der entwickelten porcinen und humanen Cornea-Konstrukte als alternative in vitro Modelle für transcorneale Permeationsuntersuchungen.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi M, Pollak OJ** (1966) Rabbit's corneal cells studied in Tissue cultures I. Morphologic and quantitative aspects. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 70:279-283
- Alberts B** (1995) *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH, Weinheim
- Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H** (1995) An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:614-621
- Asbill C, Kim N, El-Kattan A, Creek K, Wertz P, Michniak B** (2000) Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies. *Pharm Res* 17:1092-1097
- Auerbach R, Grobstein C** (1958) Inductive interaction of embryonic tissues after dissociation and reaggregation. *Exp Cell Res* 15:384-397
- Bárány EH** (1962) The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate (*Cercopithecus ethiops*). *Invest Ophthalmol* 1:712-727
- Barraquer J, Rutllán J** (1991) *Mikrochirurgie der Kornea- ein Atlas und Textbuch*, Enke-Verlag, Stuttgart
- Bauer KH, Frömming KH, Führer C** (2002) *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Baum JL, Niedra R, Davis C, Yue BYJT** (1979) Mass culture of human corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol* 97:1136-1140
- Baydoun L, Ludwig A, Müller-Goymann CC** (2002) Influence of amphiphilic starch on in vitro permeation of diclofenac sodium through porcine cornea and investigation of interaction with mucin. *ADRITELF/APGI/APV Proc. 4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, Pharmaceutical Technology*, 939-940
- Beck T, Langhage P** (1995) Auge und visuelles System. *Pharm Ztg* 140:4578-4590
- Becker B, Podos SM, Asseff CF** (1972) Microsurgery of the outflow channels, clinical research. In: Bellows JG (Hrsg) *Contemporary Ophthalmology*. St.Louis, Mosby
- Bednarz J, Weich HA, Rodokanaki von Schrenk A, Engelmann K** (1996) Einfluß der Differenzierung auf die Expression von Genen für Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren in humanen kornealen Endothelzellen. *Ophthalmologe* 93:268-274
- Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K** (2000) immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 78:130-136

- Bednarz J, Doubilei V, Wollnik PCM, Engelmann K** (2001) Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 85:1416-1420
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C** (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 76:1274-1278
- Bleckmann H, Kresse H** (1979) Influence of glycosaminoglycan synthesis of cultured cornea stroma cells by variation of culture condition. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 210:291-300
- Böhnke M, Eggli P, Engelmann K** (1999) Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope. *Cornea* 18:207-213
- Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, De Franco I, Perfetti S, Varotto A, Tenna V** (1998) Prevalence of glaucoma and intraocular pressure distribution in a defined population. The Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology* 105:209-215
- Boozchaloo S, Reichl S** (1996) Charakterisierung verschiedener Kollagene durch Gelelektrophorese. Seminararbeit, TU-Braunschweig
- Bottari F, Giannaccini B, Cristofori B, Saettone MF, Tellini N** (1978) Semisolid ophthalmic vehicles. I – A study of eye irritation in albino rabbits of a series of gel-type aqueous bases. *Farmaco* 33:424-446
- Bülow N, Ehlers N** (1968) Morphology and DOPA reaction of cultivated corneal epithelial cells. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 46:749-756
- Burgalassi S, Chetoni P, Monti D, Saettone MF** (2001) Cytotoxicity of potential ocular permeation enhancers evaluated on rabbit and human corneal epithelial cell lines. *Toxicol Lett* 122:1-8
- Camber O** (1985) An in vitro model for determination of drug permeability through the cornea. *Acta Pharm Suec* 22:335-342
- Camber O, Reh binder C, Nikkila T, Edman P** (1987) Morphology of the pig cornea in normal conditions and after incubation in a perfusion apparatus. *Acta vet Scand* 28:127-134
- Carrel A** (1912) On the permanent life of tissues outside the organism. *J Exp Med* 15:516-528
- Castro-Munozledo F, Valencia-Garcia C, Kuri-Harcuch W** (1997) Cultivation of rabbit corneal epithelial cells in serum-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2234-2244

- Chalabi RGE** (1996) Primär- und Subkultur humaner zentraler Corneaepithelzellen. Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
- Chan KY, Haschke RH** (1982) Isolation and culture of corneal cells and their interactions with dissociated trigeminal neurons. *Exp Eye Res* 35:137-156
- Chang JE, Basu SK, Lee VH** (2000) Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res* 17:670-676
- Cox RP** ed (1974) *Cell Communication*. Wiley, New York
- Dannheim F, Pfeiffer N** (1998) Empfehlungen zur medikamentösen Glaukombehandlung. *Z prakt Augenheilkd* 19: 417-423
- Deshpande G, Schoenwald RD, Barfknecht CF, Duffel MW** (2000) In vitro and ex vivo hydrolysis rates of ethacrynate esters and their relationship to intraocular pressure in the rabbit eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 16:539-556
- Dolder R, Skinner FS** (1990) *Ophthalmika – Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Doane MG, Jensen AD, Dohlmann CH** (1978) Penetration routes of topically applied eye medications. *Am J Ophthalmol* 85:383-386
- Easty DL, Carter CA, Lewkowicz-Moss SJ** (1986) Corneal cell culture and organ storage. *Trans Ophthalmol Soc UK* 105:385-396
- Ebato B, Friend J, Thoft RA** (1987) Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1450-1456
- Ebato B, Friend J, Thoft RA** (1988) Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:1533-1537
- Eggli P, Boulton M, Marshall J** (1989) Growth characteristics of central and peripheral bovine corneal epithelial cells in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 227:263-270
- Ehlers N** (1970) Morphology and histochemistry of the corneal epithelium of mammals. *Acta anat* 75:161-198
- Elbert K** (1998) Alveolare Epithelzellkultursysteme als in vitro-Modell für die pulmonale Absorption von Arzneistoffen. Dissertation, Universität des Saarlandes Saarbrücken
- El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M** (2002) Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Br J Dermatol* 147:230-243
- Ellingson DJ, Yao KT** (1971) Separation and in vitro growth of mammalian corneal epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res* 66:478-482
- Engelmann K, Böhnke M, Friedl P** (1988) Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:1656-1662

-
- Engelmann K, Böhnke M** (1989) Züchtung menschlichen Hornhautendothels in der Zellkultur. *Fortschr Ophthalmol* 86:72-75
- Engelmann K, Friedel P** (1989) Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 25:1065-1072
- Engelmann K, Friedl P** (1995) Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. *Cornea* 14:62-70
- Engelmann K, Bednarz J, Böhnke M** (1999a) Endothelzelltransplantation und Wachstumsverhalten des humanen kornealen Endothels. *Ophthalmologe* 96:555-562
- Engelmann K, Drexler D, Böhnke M** (1999b) Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea* 18:199-206
- Engelmann K, Bednarz J, Schäfer HJ, Fiedl P** (2001) Isolation and characterization of a mouse monoclonal antibody against human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 73:9-16
- Favata BV** (1964) Growth and behavior of guinea pig iris, retina and cornea in vitro. *Am J Ophthalmol* 58:651-663
- Fechner PU, Teichmann KD** (2000) *Medikamentöse Augentherapie: Grundlagen und Praxis*, Enke-Verlag, Stuttgart
- Flynn L, Yalkowsky SH, Roseman TJ** (1974) Mass transport phenomena and models: Theoretical aspects. *J Pharm Sci* 63:479-510
- Forbes DJ, Pozos RS, Nelson JD, Lima PH** (1984) Characterization of rat corneal epithelium maintained in tissue culture. *Curr Eye Res* 3:1471-1479
- Fowle AMC, Ormsby HL** (1955) Growth of cornea in tissue culture. *Am J Ophthalmol* 39:242-246
- Franke H, Galla H, Beuckmann CT** (2000) Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res Protoc* 5:248-256
- Franz TJ** (1975) Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J Invest Derm* 64:190-195
- Freshney RI** (1990) *Tierische Zellkulturen Ein Methoden-Handbuch*, Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Freshney RI, Freshney MG** (1996) *Culture of immortalized cells*, Wiley-Liss, New York
- Friedrich I, Papantoniou I, Müller-Goymann CC** (2000) Physicochemical characterization of a reverse micellar solution after loading with different drugs. *Pharmazie* 55:755-758

-
- Friend J, Kinoshita S, Thoft RA, Eliason JA** (1982) Corneal epithelial cell cultures on stromal carriers. *Invest Ophthalmol Vis sci* 23:41-49
- Fujita T, Tanaka K, Tokunaga J** (1986) Zellen und Gewebe – Ein REM-Atlas für Mediziner und Biologen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Fusenig NE, Breitkreutz D, Dzarlieva RT, Boukamp P, Herzmann E, Bohnert A, Pölmann J, Rausch C, Schütz S, Hornung J** (1982) Epidermal cell differentiation and malignant transformation in culture, *Cancer Forum* 6:209-240
- Gay R, Swiderek M, Nelson D, Ernesti A** (1992) The living skin equivalent as a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxic in Vitro* 6:303-315
- Geggel HS, Friend J, Thoft RA** (1985) Collagen gel for ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:901-905
- Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier L, Bouvard V, Auger FA** (1993) Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 19:99-104
- Germain L, Auger FA, Grandbois E, Guignard R, Giasson M, Boisjoly H, Guerin SL** (1999) Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 67:140-147
- Germain L, Carrier P, Auger FA, Salesse C, Guerin SL** (2000) Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? *Prog Retin Eye Res* 19:497-527
- Gipson IK, Grill SM** (1982) A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23:269-273
- Glassman AB, Coles WH, Bennett CE** (1979) Corneal endothelium: a modified method for cultivation. *In Vitro* 15:873-876
- Goskonda VR, Khan MA, Hutak CM, Reddy IK** (1999) Permeability characteristics of novel mydriatic agents using an in vitro cell culture model that utilizes SIRC rabbit corneal cells. *J Pharm Sci* 88:180-184
- Goskonda VR, Hill RA, Khan MA, Reddy IK** (2000) Permeability of chemical delivery systems across rabbit corneal (SIRC) cell line and isolated corneas: a comparative study. *Pharm Dev Technol* 5:409-416
- Gospodarowicz D, Greenburg G, Foidart JM, Savidon N** (1981) The production and localization of laminin in cultured vascular and corneal endothelial cells. *J Cell Physiol* 107:171-173
- Grass GM, Robinson JR** (1988a) Mechanisms of corneal drug penetration. I: In vivo and in vitro kinetics. *J Pharm Sci* 77:3-14

-
- Grass GM, Robinson JR** (1988b) Mechanisms of corneal drug penetration. II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement. *J Pharm Sci* 77:15-23
- Grass GM, Cooper ER, Robinson JR** (1988) Mechanisms of corneal drug penetration. III: Modeling of molecular transport. *J Pharm Sci* 77:24-26
- Greaves JL, Olejnik O, Wilson CG** (1992) Polymers and the precorneal tear film. *STP Pharma Sciences* 2:13-33
- Green H** (1977) Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* 11:405-416
- Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, Hakim M, Song Y, Watsky MA** (1999) Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286:2169-2172
- Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH** (1995) Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 268(3 Pt 1):L347-60
- Guidry C, Grinnell F** (1985) Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *J Cell Sci* 79:67-81
- Gupta M, Majumdar DK** (1997) Effect of concentration, pH, and preservative on in vitro transcorneal permeation of ibuprofen and flurbiprofen from non-buffered aqueous drops. *Indian J Exp Biol* 35:844-849
- Hackworth LA, Faraji-Shadan F, Schuschereba ST, Bowman PD** (1990) Serum-free culture of porcine and rabbit corneal epithelial cells. *Curr Eye Res* 9:919-923
- Harrison RG** (1907) Observations on the living developing nerve fiber. *Proc Soc Exp Biol Med* 4:140-143
- Haße A, Keipert S** (1997) Development and characterization of microemulsions for ocular application. *Eur J Pharm Biopharm* 43:179-183
- Hayashi K, Sueishi K, Tanaka K, Inomata H** (1986) Immunohistochemical evidence of the origin of human corneal endothelial cells and keratocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224:452-456
- He YG, McCulley JP** (1991) Growing human corneal epithelium on collagen shield and subsequent transfer to denuded cornea in vitro. *Curr Eye Res* 10:851-863
- Hibino T, Wada Y, Mishima H, Otori T** (1998) The effect of corneal epithelial cells on the collagen gel contraction by keratocytes. *Jpn J Ophthalmol* 42:174-179
- Hidalgo IJ, Li J** (1996) Carrier-mediated transport and efflux mechanism in caco-2 cells. *Adv Drug Deliv Rev* 22:53-66
- Ho PC, Davis WH, Elliott JH, Cohen S** (1974) Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol* 13:804-809

-
- Hyldahl L, Auer G, Sundelin B** (1982) A novel method to establish primary cultures of bovine corneal endothelial cells. *Cell Biol Int Rep* 6:523-528
- Jacobsen J, van Deurs B, Pedersen M, Rassing MR** (1995) TR146 cell grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties and permeability. *Int J Pharm* 125:165-184
- Kahn CR, Young E, Lee IH, Rhim JS** (1993) Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:3429-3441
- Kanski JJ, Spitznas M** (1987) *Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie*, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York
- Kawazu K, Shiono H, Tanioka H, Ota A, Ikuse T, Takashina H, Kawashima Y** (1998) Beta adrenergic antagonist permeation across cultured rabbit corneal epithelial cells grown on permeable supports. *Curr Eye Res* 17:125-131
- Keipert S** (1998) Ophthalmika: etablierte Arzneiformen und neue Konzepte. In: Müller RH, Hildebrand GE (Hrsg) *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Kinsey, Adler** (1983) Die Permeabilität der Hornhaut. In: Dolder R, Skinner FS (Hrsg) *Ophthalmika – Pharmakologie, Biopharmazie und Galenik der Augenarzneimittel*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Knipp GT, Ho NF, Barsuhn CL, Borchardt RT** (1997) Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J Pharm Sci* 86:1105-1110
- Köhler G, Milstein C** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:496-497
- Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S** (2002) An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2114-2121
- Krejci L, Harrison R** (1970a) Epinephrine effects on corneal cells in tissue culture. *Arch Ophthalmol* 83:451-454
- Krejci L, Harrison R** (1970b) Antiglaucoma drug effects on corneal epithelium. A comparative study in tissue culture. *Arch Ophthalmol* 84:766-769
- Kruszewski FH, Walker TL, DiPasquale LC** (1997) Evaluation of a human corneal epithelial cell line as an in vitro model for assessing ocular irritation. *Fundam Appl Toxicol* 36:130-140

-
- Kühnel W, Mendoza AS** (1987) Morphologie der Cornea. Fortschr Ophthalmol 84:217-224
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Lee VH, Robinson JR** (1986) Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges. J Ocular Phamacol 2:67-108
- Lehr CM** (2002) Cell culture models of biological barriers. Taylor & Francis, London, New York
- Lovelock JE, Bishop MWH** (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. Nature 183:1394-1395
- Malhotra M, Majumdar DK** (2001) Permeation through cornea. Indian J Exp Biol 39:11-24
- Mannagh J, Irvine AR** (1965) Human corneal endothelium: growth in tissue cultures. Arch Ophthalmol 74:847-849
- Matsui J** (1929) Über die in vitro Kultur des Endothels der Membrana Descemetii. Arch f Exp Zellforschung 8:553
- Maurice DM, Mishima S** (1984) Ocular Pharmacokinetics. In: Sears ML (Hrsg) Pharmacology of the eye, Springer-Verlag, Berlin
- McCallum DK, Lillie JH, Scaletta LJ, Occhino JC, Frederick WG, Ledbetter SR** (1982) Bovine corneal endothelium in vitro. Exp Cell Res 139:1-13
- Meisner D, Mezei M** (1995) Liposome ocular delivery systems. Advanved Drug Delivery Reviews 16:75-93
- Meller D, Kruse F** (2001) Ex-vivo-Expansion kornealer Stammzellen. Ophthalmolge 98:811-817
- Minami Y, Sugihara H, Oono S** (1993) Reconstruction of cornea in three-dimensional collagengel matrix culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 34:2316-2324
- Mitra AK, Mikkelson TJ** (1988) Mechanism of transcorneal permeation of pilocarpine. J Pharm Sci 77:771-775
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R** (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31:11-24
- Müller-Goymann** (1998) Arzneimittel mit Flüssigkristallen. In: Müller RH, Hildebrand GE (Hrsg) Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Müller-Goymann CC, Hamann HJ** (1993) Sustained drug release from reverse micellar solutions by phase transformation into lamellar liquid crystals. J Control Release 23:165-174

- Nagano F** (1914) Untersuchungen zur Pathologie des Hornhautendothels. Arch f Augenheilkunde 76:26-79
- Nayak SK, Binder PS** (1984) The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 25:1213-1216
- Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RT** (1996) The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. Pharm Res 13:528-534
- Neville R, Dennis P, Sens D, Crouch R** (1986) Preservative cytotoxicity to cultured corneal epithelial cells. Curr Eye Res 5:367-372
- Newsome DA, Takasugi M, Kenyon KR, Stark WF, Opelz G** (1974) Human corneal cells in vitro: morphology and histocompatibility (HL-A) antigens of pure cell populations. Invest Ophthalmol 13:23-32
- Nishida T, Ueda A, Fukuda M, Mishima H, Yasumoto K, Otori T** (1988) Interactions of extracellular collagen and corneal fibroblasts: morphologic and biochemical changes of rabbit corneal cells cultured in a collagen matrix. In Vitro Cell Dev Biol 24:1009-1014
- Nishida T** (1997) Chapter 1: Cornea. In: Krachmer JH (Hrsg) Cornea, St.Louis, Mosby
- Offord EA, Sharif NA, Mace K, Tromvoukis Y, Spillare EA, Avanti O, Howe WE, Pfeifer AM** (1999) Immortalized human corneal epithelial cells for ocular toxicity and inflammation studies. Invest Ophthalmol Vis Sci 40:1091-1101
- Ober D** (1997) Strategien zur immunologischen und molekularbiologischen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. Dissertation, TU-Braunschweig
- Oh J** (1963) Changes with age in the corneal endothelium of normal rabbits. Acta Ophthalmologica 41:568
- Ohji M, SundarRaj N, Hassell JR, Thoft RA** (1994) Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 35:479-485
- Orwin EJ, Hubel A** (2000) In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial and keratocyte cells in a native collagen matrix. Tissue Eng 6:307-319
- Pancholi S, Tullo A, Khaliq A, Foreman D, Boulton M** (1998) The effects of growth factors and conditioned media on the proliferation of human corneal epithelial cells and keratocytes. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 236:1-8
- Papantoniou I** (1995) Invers mizellare Lösungen mit modifizierter Wirkstofffreisetzung durch applikationsinduzierte Transformation in lyotrope Mesophasen. Dissertation, TU-Braunschweig

-
- Parenteau N** (1994) Skin equivalents. In: Leigh I, Watt F (Hrsg) Keratinocyte methods, Cambridge University Press
- Parnigotto PP, Bassani V, Gottardo A, Conconi MT, Valenti F** (1996) Growth, morphology, morphometry and keratin patterns of bovine corneal epithelial cells cultured in vitro. *Anat Anz* 178:545-551
- Parnigotto PP, Bassani V, Montesi F, Conconi MT** (1998) Bovine corneal stroma and epithelium reconstructed in vitro: characterisation and response to surfactants. *Eye* 12:304-310
- Perlman M, Baum JL** (1974) The mass culture of rabbit corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol* 92:235-237
- Pfister RR, Burstein N** (1976) The effects of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium: a scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol* 15:246-259
- Pistov MY, Sadovnikova EY, Danilov SM** (1988) Human corneal endothelial cells: Isolation, characterization and long-term cultivation. *Exp Eye Res* 47:403-414
- Podos SM, Becker B, Asseff C, Hartstein J** (1972) Pilocarpine therapy with soft contact lenses. *Am J Ophthalmol* 73:336-341
- Prausnitz MR, Noonan JS** (1998) Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. *J Pharm Sci* 87:1479-1488
- Prunieras M, Régnier M, Woodley D** (1983) Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 81(1 Suppl):28s-33s
- Quigley HA** (1987) Reappraisal of the mechanisms of glaucomatous optic nerve damage. *Eye* 1:318-322
- Radda TM, Menzel EJ** (1983) Kollagentypen in menschlicher Kornea und Sklera. *Fortsch Ophthalmol* 79:460-462
- Régnier M, Caron D, Reichert U, Schaefer H** (1992) Reconstructed human epidermis: a model to study in vitro the barrier function of the skin. *Skin Pharmacol* 5:49-56
- Rodrigues M, Ben-Zvi A, Krachmer J, Schermer A, Sun TT** (1987) Suprabasal expression of a 64-kilodalton keratin (no. 3) in developing human corneal epithelium. *Differentiation* 34:60-67
- Rohen JW** (1996) Funktionelle Anatomie von Kornea, Episklera und Konjunktiva. In: Kampik A, Grehn F (Hrsg) Das äussere Auge: Hauptreferate der XXXI. Essener Fortbildung für Augenärzte, Enke-Verlag, Stuttgart

- Rozier A, Mazuel C, Grove J, Plazonnet B** (1989) Gelrite®: A novel, ion-activated, in-situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol. *Int J Pharm* 57:163-168
- Saettone MF, Salminen L** (1995) Ocular inserts for topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16:95-106
- Sarkar P, Basu PK, Miller I** (1962) Karyologic studies on cells from rabbit corneal and other tissues grown in vitro. *Invest Ophthalmol* 1:33
- Sarkar P, Basu PK, Carré F** (1966) Bovine corneal epithelium in tissue culture. Chromosomal stability in a serially subcultured line. *Am J Ophthalmol* 61:553-557
- Sasaki H, Igarashi Y, Nagano T, Nishida K, Nakamura J** (1995) Different effects of absorption promoters on corneal and conjunctival penetration of ophthalmic beta-blockers. *Pharm Res* 12:1146-1150
- Savion N, Isaacs JD, Shuman MA, Gospodarowicz D** (1982) Proliferation and differentiation of bovine corneal endothelial cells in culture. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol* 6:305-320
- Schermer A, Galvin S, Sun TT** (1986) Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103:49-62
- Schneider AI** (1997) Entwicklungen zu einem In-vitro-Cornea-Modell im Hinblick auf eine Alternative zum Draize-Test. Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Fraunhofer-IRB-Verlag, Stuttgart
- Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T** (1997) The use of an in vitro cornea for predicting ocular toxicity. *In vitro toxicol* 10:309-318
- Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T** (1999) Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:515-526
- Schoenwald RD, Ward RL, DeSantis LM, Roehrs RE** (1978) Influence of high-viscosity vehicles on miotic effect of pilocarpine. *J Pharm Sci* 67:1280-3
- Schoenwald RD** (1990) Ocular drug delivery. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 18:255-269
- Scholz M, Schrunder S, Gartner S, Keipert S, Hartmann C, Pleyer U** (2002) Ocular drug permeation following experimental excimer laser treatment on the isolated pig eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 18:177-183

-
- Sharif NA, Wiernas TK, Howe WE, Griffin BW, Offord EA, Pfeifer AM** (1998) Human corneal epithelial cell functional responses to inflammatory agents and their antagonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2562-2571
- Siefert B, Keipert S** (1997) Influence of alpha-cyclodextrin and hydroxyalkylated beta-cyclodextrin derivatives on the in vitro corneal uptake and permeation of aqueous pilocarpine-HCl solutions. *J Pharm Sci* 86:716-720
- Sieg JW, Robinson JR** (1976) Mechanistic studies on transcorneal permeation of pilocarpine. *J Pharm Sci* 65:1816-1822
- Sieg JW, Robinson JR** (1981) Mechanistic studies on transcorneal permeation of fluorometholone. *J Pharm Sci* 70:1026-1029
- Slick WC, Mannagh J, Yuhasz Z** (1965) Enzymatic removal and pure culture of rabbit corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol* 73:229-232
- Smith AU, Ashwood-Smith MJ, Young MR** (1963) Some in vitro studies on rabbit corneal tissue. *Exp Eye Res* 2:71-87
- Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC** (2001) Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 85:444-449
- Specht C** (1998) Entwicklung organotypischer Hautäquivalente und ihre Testung auf Eignung für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen. Dissertation, TU-Braunschweig
- Specht C, Stoye I, Müller-Goymann CC** (1998) Comparative investigations to evaluate the use of organotypic cultures of transformed and native dermal and epidermal cells for permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm* 46:273-278
- Speckmann EJ, Wittkowski W** (1994) Bau und Funktion des menschlichen Körpers, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- Spurr SJ, Gipson IK** (1985) Isolation of corneal epithelium with dispase II or EDTA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 :818-827
- Stock EL, Kurpakus MA, Sambol B, Jones JC** (1992) Adhesion complex formation after small keratectomy wounds in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:304-313
- Stocker FW, Eiring A, Georgiade R, Georgiade N** (1958) A tissue culture technique for growing corneal epithelial, stromal, and endothelial tissues separately. *Am J Ophthalmol* 46:294-298
- Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakagawa S, Manabe R** (1981) Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. *Curr Eye Res* 1:553-556

- Suhonen P, Sporty J, Lee VHL, Urtti A** (2002) Cell culture models of the corneal and conjunctival epithelium. In: Lehr CM (Hrsg) Cell culture models of biological barriers, Taylor & Francis, London, New York
- Sun TT, Vidrich A** (1981) Keratin filaments of corneal epithelial cells. *Vision Research* 21:55-63
- Svedberg B, Bill A** (1972) Scanning electron microscopic studies of the corneal endothelium in man and monkeys. *Acta Ophthalmol* 50:321-336
- Takahashi I, Sashima S, Nakazawa K** (2001) Comparative analysis of proteoglycans synthesized by chick corneal stromal cells in cell culture and organ culture. *Biol Pharm Bull* 24:27-33
- Tang-Liu DD, Richman JB, Weinkam RJ, Takruri H** (1994) Effects of four penetration enhancers on corneal permeability of drugs in vitro. *J Pharm Sci* 83:85-90
- Tegtmeyer S** (2000) Kultivierung und Charakterisierung von bovinen in vitro Cornea-Modellen für Permeationsuntersuchungen. Dissertation, TU-Braunschweig
- Tegtmeyer S, Papantoniou I, Müller-Goymann CC** (2001) Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* 51:119-125
- Thygeson P** (1939) Cultivation in vitro of human conjunctival and corneal epithelium. *Am J Ophthalmol* 22:649-654
- Tonjum AM** (1975) Permeability of rabbit corneal epithelium to horseradish peroxidase after the influence of benzalkonium chloride. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 53:335-347
- Toropainen E, Ranta VP, Talvitie A, Suhonen P, Urtti A** (2001) Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2942-2948
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76:4350-4354
- Tseng SC, Savion N, Gospodarowicz D, Stern R** (1981) Characterization of collagens synthesized by cultured bovine corneal endothelial cells. *J Biol Chem* 256:3361-3365
- Tseng SC, Kruse FE, Merritt J, Li DQ** (1996) Comparison between serum-free and fibroblast-cocultured single-cell clonal culture systems: evidence showing that epithelial anti-apoptotic activity is present in 3T3 fibroblast-conditioned media. *Curr Eye Res* 15:973-984
- van der Bijl P, van Eyk AD, Meyer D** (2001) Effects of three penetration enhancers on transcorneal permeation of cyclosporine. *Cornea* 20:505-508

- Vogel WH, Berke A** (1998) Okuläre Pharmakologie: biologische Grundlagen der okulären Arzneimittelwirkungen für Optometristen, Mediziner und Pharmazeuten, Enke-Verlag, Stuttgart
- Von der Eltz C** (2000) Drucksenkung und Verbesserung der okulären Durchblutung. Pharm Ztg 145:1646-1648
- von Sallmann L, Caravaggio LL, Grimes P** (1961) Studies on the corneal endothelium of the rabbit. I. Cell division and growth. Am J Ophthalmol 51 (pt.2):955
- Waltman SR, Kaufman HE** (1970) Use of hydrophilic contact lenses to increase ocular penetration of topical drugs. Invest Ophthalmol 9:250-255
- Way SE, Hadgraft J** (1991) In vitro investigation of the permeation and metabolism of hydrocortisone and hydrocortisone-21-esters. In: Scott RC, Guy RH, Hadgraft J, Boddé HE (Hrsg) Prediction of percutaneous penetration Vol.2, BC Technical Services, London
- Weimar V, Fellman M** (1970) Connective tissue cell mobilization and migration following wounding. I. Inhibition of mobilization by chloroquine and inhibition of migration by colchicine. Exp Eye Res 9:12-21
- Wensor MD, McCarty CA, Stanislavsky YL, Livingston PM, Taylor HR** (1998) The prevalence of glaucoma in the Melbourne Visual Impairment Project. Ophthalmology 105:733-739
- Wilisch IL** (1994) Veränderung der kolloidalen Struktur von Lecithinassoziaten bzw. Stratum corneum durch unterschiedliche Ölkomponenten und Fenoprofen im Hinblick auf Arzneistofffreigabe und -permeation durch exzidierte Humanhaut. Dissertation, TU-Braunschweig
- Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun TT** (1982) Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. J Cell Biol 95:580-588
- Yanoff M** (1976) Biology in vitro of corneal epithelium and endothelium. Doc Ophthalmol 41:157-204.
- Yue BY, Baum JL, Silbert JE** (1978) Synthesis of glycosaminoglycans by cultures of normal human corneal endothelial and stromal cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 17:523-527
- Yue BY, Baum JL, Smith BD** (1983) Identification of collagens synthesized by cultures of normal human corneal and keratoconus stromal cells. Biochim Biophys Acta 755:318-325
- Yue BY, Sugar J, Gilboy JE, Elvart JL** (1989) Growth of human corneal endothelial cells in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 30:248-253
- Zieske JD, Mason VS, Wasson ME, Meunier SF, Nolte CJ, Fukai N, Olsen BR, Parenteau NL** (1994) Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal

cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res* 214:621-633

Zignani M, Tabatabay C, Gurny R (1995) Topical semi-solid drug delivery: kinetics and tolerance of ophthalmic hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16:51-60

Zimmer A, Kreuter J (1995) Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16:61-73